

**TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE THERAPEUTISCHE BEEINFLUSSUNG
DES VERBRENNUNGSSCHOCKS DURCH
NEUE NIEDERMOLEKULARE, POLYVALENTE
PROTEINASENINHIBITOREN AUS
WEINBERGSCHNECKEN UND
MIKROBIELLEN KULTURFILTRATEN**

Gerald Kwiecinski

1976

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Biochemie der
Universität München
Komm.Leiter: Prof.Dr.rer.nat. et med.habil. H. F r i t z

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE THERAPEUTI-
SCHE BEEINFLUSSUNG DES VERBRENNUNGSSCHOCKS DURCH NEUE
NIEDERMOLEKULARE, POLYVALENTE PROTEINASENINHIBITOREN
AUS WEINBERGSCHNECKEN UND MIKROBIELLEN KULTURFILTRATEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gerald K w i e c i n s k i
aus München

München 1976

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Fritz

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juni 1976



MEINER FRAU MONIKA

1.	Einleitung
2.	Die Bedeutung der Musik in der menschlichen Kultur
3.	Die Entwicklung der Musik von den Anfängen bis zur Gegenwart
4.	Die Musik als Kunstform und als gesellschaftliche Funktion
5.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Seele
6.	Die Musik als Spiegelbild der menschlichen Existenz
7.	Die Musik als Brücke zwischen den Kulturen
8.	Die Musik als Heilmittel und als Therapie
9.	Die Musik als Quelle der Inspiration
10.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Freiheit
11.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Liebe
12.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Hoffnung
13.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Sehnsucht
14.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Einsamkeit
15.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Verbundenheit
16.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Identität
17.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Individualität
18.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Kreativität
19.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Intelligenz
20.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Schönheit
21.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Harmonie
22.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Dissonanz
23.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Spannung
24.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Entspannung
25.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Freude
26.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Traurigkeit
27.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Sehnsucht
28.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Hoffnung
29.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Liebe
30.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Freiheit
31.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Identität
32.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Individualität
33.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Kreativität
34.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Intelligenz
35.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Schönheit
36.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Harmonie
37.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Dissonanz
38.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Spannung
39.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Entspannung
40.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Freude
41.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Traurigkeit
42.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Sehnsucht
43.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Hoffnung
44.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Liebe
45.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Freiheit
46.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Identität
47.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Individualität
48.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Kreativität
49.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Intelligenz
50.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Schönheit
51.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Harmonie
52.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Dissonanz
53.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Spannung
54.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Entspannung
55.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Freude
56.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Traurigkeit
57.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Sehnsucht
58.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Hoffnung
59.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Liebe
60.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Freiheit
61.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Identität
62.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Individualität
63.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Kreativität
64.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Intelligenz
65.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Schönheit
66.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Harmonie
67.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Dissonanz
68.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Spannung
69.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Entspannung
70.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Freude
71.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Traurigkeit
72.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Sehnsucht
73.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Hoffnung
74.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Liebe
75.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Freiheit
76.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Identität
77.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Individualität
78.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Kreativität
79.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Intelligenz
80.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Schönheit
81.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Harmonie
82.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Dissonanz
83.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Spannung
84.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Entspannung
85.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Freude
86.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Traurigkeit
87.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Sehnsucht
88.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Hoffnung
89.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Liebe
90.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Freiheit
91.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Identität
92.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Individualität
93.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Kreativität
94.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Intelligenz
95.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Schönheit
96.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Harmonie
97.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Dissonanz
98.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Spannung
99.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Entspannung
100.	Die Musik als Ausdruck der menschlichen Freude

Aufgabe unserer Untersuchungen war es, die therapeutische und prophylaktische Wirkung verschiedener neuartiger Proteinaseinhibitoren und des Heparin gegenüber dem bekannten Proteinaseinhibitor Trasylol anhand der Überlebenszeit und -rate von Ratten zu vergleichen, bei denen durch eine standardisierte Verbrühung ein akuter Schockzustand induziert wurde.

Außerdem wurden histologische Untersuchungen von Niere, Leber und Lunge vorgenommen, um eventuelle Veränderungen durch die Proteinaseinhibitoren in diesen Organen festzustellen.

Sämtliche Experimente wurden von cand.med. D. SPELSBERG und mir im Rahmen einer Arbeitsgemeinschaft durchgeführt und die Ergebnisse nach Abschluß der Untersuchungen in zwei Themengebiete aufgeteilt.

SPELSBERG vergleicht die Wirkungen von Heparin und einem neuartigen Inhibitor aus Seeanemonen mit Trasylol.

Im Rahmen meiner Arbeit werden die Wirkungen von zwei kürzlich entdeckten Inhibitoren aus Weinbergschnecken (= Helicin) und aus mikrobiellen Kulturfiltraten (= Leupeptin) der therapeutischen Wirksamkeit des Trasylol gegenübergestellt.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
B GESCHICHTE, CHEMIE UND WIRKUNGEN DES KALLIKREIN, DES KININSYSTEMS UND SEINER INHIBITOREN	4
1. Geschichte der Entdeckung des Kallikrein und des Kininsystems	4
1.1. Chemie des Kallikrein und der Kinine	5
1.2. Wirkungen des Kallikrein und der Kinine	6
2. Geschichte und Entdeckung des Trasylol	9
2.1. Chemie des Trasylol	11
2.2. Wirkungen des Trasylol	14
3. Entdeckung des Proteinaseinhibitoren aus Weinbergsschnecken (<i>Helix pomatia</i>)	18
3.1. Isolierung des Proteinaseinhibitoren aus Weinbergsschnecken	18
3.1.1. Material und Methodik	19
3.1.2. Schneckenmaterial	19
3.1.3. Gewinnung des Rohextraktes	19
3.1.4. Ammoniumsulfatfällung	19
3.1.5. Bindung an Trypsinharz und Gewinnung des Inhibitors	19
3.2. Chemische Eigenschaften und Wirkungen des Proteinaseinhibitoren aus Weinbergsschnecken	22
4. Vergleich der Verteilung und Ausscheidung der Proteinaseinhibitoren aus Rinderorganen (Trasylol) und aus Weinbergsschnecken (<i>Helix</i> <i>cin</i>)	24
5. Entdeckung des Leupeptin und des Antipain	28
5.1. Chemie und Wirkungen des Leupeptin	28
C DIE VERBRENNUNGSKRANKHEIT	34
6. Pathophysiologie des Verbrühungsschocks	34
6.1. Burn Syndrom	35
6.2. Lokales Geschehen	36
6.2.1. Permeabilitätsschädigung der Kapillaren	37
6.2.2. Angriffspunkte der vasoaktiven Stoffe	39

6.3.	Mediatoren	41
6.3.1.	Typ I: Kinine und Prostaglandine	42
6.3.2.	Typ II: Proteasen und spezifische Faktoren	43
6.4.	Flüssigkeitsverlust und Hämokonzentration	44
6.5.	Störung der Mikrozirkulation	44
6.6.	Circulus vitiosus des Schocks	46
6.6.1.	Hyperkoagulabilität	46
6.6.2.	Azidose	46
6.6.3.	Strömungsverlangsamung	47
6.6.4.	Verbrauchskoagulopathie	47
6.6.5.	Hyperfibrinolyse	49
6.6.6.	Proteolyse	51
7.	Pathophysiologische Bedeutung der proteolytischen Enzyme und des Trasylol im Verbrühungsschock	54
7.1.	Proteolytische Enzyme	54
7.1.1.	Inhibition proteolytischer Enzyme durch Trasylol	58
7.2.	Das Verbrühungsschockmodell	59
D	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	62
8.	Versuchstiere	62
8.1.	Haltung und Fütterung der Tiere	62
8.2.	Vorbereitung der Tiere für den Versuch	62
9.	Versuchsbeschreibung	64
10.	1. Hitzeschockversuch	67
10.1.	Trasylol - Helicin	67
10.1.1.	Durchführung des Versuches	68
10.1.2.	Ergebnisse	69
10.1.3.	Statistik	70
10.1.4.	Graphiken	72
11.	2. Hitzeschockversuch	74
11.1.	Trasylol - Helicin	74
11.1.1.	Durchführung des Versuches	74
11.1.2.	Ergebnisse	74
11.1.3.	Statistik	75

III

	Seite
11.1.4.	Graphiken 76
12.	3. Hitzeschockversuch 78
12.1.	Trasylo1 - Leupeptin 78
12.1.1.	Durchführung des Versuches 79
12.1.2.	Ergebnisse 80
12.1.3.	Statistik 80
12.1.4.	Graphiken 81
13.	4. Hitzeschockversuch 83
13.1.	Trasylo1/Leupeptin - Leupeptin 83
13.1.1.	Durchführung des Versuches 83
13.1.2.	Ergebnisse 84
13.1.3.	Statistik 84
13.1.4.	Graphiken 85
14.	Histologie 88
14.1.	Methodik 88
14.1.2.	Begründung der Methodik 89
14.2.	Parameter der histologischen Beurteilung 90
14.3.	Ergebnisse 92
14.3.1.	Lunge 92
14.3.2.	Niere 94
14.3.3.	Leber 95
14.4.	Zusammenfassung 96
15.	Diskussion 97
15.1.	1. und 2. Versuch: Trasylo1 - Helicin 97
15.2.	3. Versuch: Trasylo1 - Leupeptin 99
15.3.	4. Versuch: Trasylo1/Leupeptin - Leupeptin 100
16.	Schlußfolgerungen 102
17.	ZUSAMMENFASSUNG 107
18.	LITERATURVERZEICHNIS 108
	Lebenslauf

A

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Täglich ereignen sich im Haushalt, auf der Straße und am Arbeitsplatz tausende von Unfällen, die mehr oder weniger starke Verbrennungen zur Folge haben. Erhitzen des Gewebes auf 70°C und darüber führt zu schweren pathophysiologischen Veränderungen, die man als Verbrennungskrankheit bezeichnet. Eines der kennzeichnenden und augenscheinlichen Ereignisse der Verbrennungskrankheit ist die erhebliche Flüssigkeitsverschiebung, die im Organismus stattfindet. Durch die erhöhte Kapillarpermeabilität bedingt, verläßt eine eiweißreiche Flüssigkeit die Blutbahn - sekundär auch das Interstitium im nichtverbrannten Gebiet - und tritt am Verbrennungsort als Wundexsudation in Erscheinung oder liegt ohne erhebliches Nässen nach außen als Ödem im Gewebe. Diese Flüssigkeitsverluste können bei ausgedehnten Verbrennungen sehr erhebliche Werte erreichen. Es können 20 - 60% des zirkulierenden Volumens - das sind beim Erwachsenen 2 - 3 l Blut - in kurzer Zeit den nichtverbrannten Körperteilen entzogen werden. Die dadurch erfolgende plötzliche Verminderung der zirkulierenden Blutmenge ist die wichtigste Ursache für eine akute Kreislaufinsuffizienz. Die Verbrennungskrankheit, die außerdem mit einer Fröhämolyse und mit einem starken Verlust an Elektrolyten einhergeht, ist immer mit einem Schock vergesellschaftet.

Da der Ersatz von Blutkörperchen, Serum-Eiweiß, Elektrolyten und Wasser heute in optimaler Weise möglich ist, kann die Ursache für den Tod nach Verbrennungen nicht im Volumenmangel bzw. in Störungen des Elektrolyt-Haushaltes liegen. Die Ursache für den häufig tödlichen Ausgang solcher Traumen ist nach KOSLOWSKI (74) in einer Enzym-entgleisung zu suchen, die ein wesentlicher Bestandteil des Schocks ist.

Das Kernsymptom des Schocks ist die reduzierte Mikroirkulation. Sie kann auf drei Mechanismen basieren: der Vasokonstriktion, der Vasoocclusion durch Thrombusbildung und der Vasokompression durch Bildung eines perivaskulären Ödems. Am Zustandekommen der beiden letztgenannten Mechanismen spielen die Proteasen eine führende Rolle.

Von größter Bedeutung ist die Frage, ob es möglich ist, die Verbrennungskrankheit und den sie begleitenden Schock kausal zu therapieren. Kausale Therapie heißt, dort in das Schockgeschehen einzugreifen, wo es zur Freisetzung von proteolytischen Enzymen kommt, die ihrerseits die nachfolgende Bildung toxischer Peptide, die Kininaktivierung, die erhöhte Kapillarpermeabilität und die Hyperosmose bewirken.

Durch die Arbeit von WERLE, KRAUT und FREY, die 1925 die Proteinase Kallikrein und 1927 ein inhibitorisches Prinzip des Kallikrein, den sogenannten FREY-Inhibitor, später Trasylol genannt, entdeckten, wurde die Tür für eine derartige Therapie geöffnet.

Leider wird auch heute noch von der vorhandenen Möglichkeit, Enzyminhibitoren in der Schockbekämpfung einzusetzen, in Klinik und Praxis nicht oder nur wenig Gebrauch gemacht.

Daher sind verschiedene, voneinander unabhängige Arbeitsgruppen ständig darum bemüht, neue, verbesserte Enzyminhibitoren zu finden, um die täglich tausendfach auftretenden Schockfolgen wirkungsvoller bekämpfen zu können.

In allerjüngster Zeit ist es durch intensive Forschung gelungen, neue Inhibitoren zu isolieren: TSCHESCHE und DIETL isolierten aus Weinbergschnecken (= *Helix pomatia*), FRITZ und WUNDERER aus Seeanemomen (= *Anemonia sulcata*) und UMEZAWA aus mikrobiellen Kulturfiltraten (= *Streptomyceten*) bisher unbekannte Hemmstoffe, die den Eigen-

schaften des bisher einzigen therapeutisch einsetzbaren
Proteinaseninhibitors, Trasylol, ähneln und die in vitro
die gleichen Hemmeigenschaften zeigten.

Ziel dieser Arbeit ist es, die neuen Inhibitoren und das
Trasylol im Tierexperiment zu erproben, die Wirkungen der
genannten Stoffe im Verbrennungsschock zu objektivieren
und die so gewonnenen Ergebnisse einander gegenüberzustel-
len.

B

GESCHICHTE, CHEMIE UND WIRKUNGEN DES KALLIKREIN,
DES KININSYSTEMS UND SEINER INHIBITOREN

1.

Geschichte der Entdeckung des Kallikrein
und des Kininsystems

ABELOUS und BARDIER hatten bereits im Jahre 1909 im Urin eine blutdrucksenkende Substanz entdeckt, die sie Urohypotensin nannten.

1925 erkannte FREY, daß der mittlere Blutdruck von Hunden durch intravenöse Harninjektion im Sinne einer Blutdrucksenkung zu beeinflussen ist (34). Zusammen mit WILLSTAEDTER gelang es ihm, die hochmolekulare, thermolabile Substanz, die zunächst F-Substanz (FREY-Substanz) genannt wurde, zu isolieren. Auf der Suche nach dem Entstehungsort der F-Substanz fand der Arbeitskreis FREY, KRAUT und WERLE große Mengen dieser Substanz in Pankreasextrakten von Rind, Schwein und Mensch. Da das Pankreas als Ursprungsort angenommen wurde, taufte man die F-Substanz in Kallikrein (griechisch: Kallikreos = Pankreas) um.

FREY konnte in Zusammenarbeit mit KRAUT nachweisen, daß diese blutdrucksenkende Substanz durch Kontakt mit Plasma inaktiviert wird. WERLE erkannte, daß das Kallikrein im Pankreassekret größtenteils als inaktive Vorstufe vorliegt, die durch Trypsin aktivierbar ist (144). Weiterhin entdeckte er, daß Kallikrein auch in Speicheldrüsen, Nieren und im Darm gebildet wird (143), was u.a. durch Untersuchungen von ERDÖS (120) und ZEITLIN (155) bestätigt wurde.

In jüngster Zeit wurden von MORIWAKI et al. in den Samenrüsen des Meerschweinchens (96) und von FRITZ in den Akrosomen der menschlichen Spermatozyten (40) Enzyme, die kallikreinähnlich sind, gefunden.

1936 entdeckte WERLE (145) eine Substanz, die durch Einwirkung von Kallikrein auf Serum entsteht und die eine vielfach höhere Kreislaufaktivität besitzt als das Kallikrein selbst. Er bezeichnete diese Substanz als Kallidin und das Kallikreinsubstrat als Kallidinogen.

1949 fand ROCHA e SILVA eine weitere blutdrucksenkende Substanz, die durch die Proteinase Kallikrein aus dem Blutserum freigesetzt wird: das Nonapeptid Bradykinin (116).

WERLE erkannte 1950, daß Kallidin und Bradykinin aus demselben Substrat im Plasma, einer α_2 -Globulinfraktion, stammen; die Isolierung, Sequenzanalyse und Synthese beider Substanzen erfolgte 1960 - 1962 (130, 103). Die durch das Kallikrein freigesetzten Substanzen werden allgemein als Kinine, ihre inaktiven Vorstufen als Kininogene und die Enzyme, die Kinin aus Kininogen freisetzen, als Kininogenasen bezeichnet. Das Verdienst, erkannt zu haben, daß die Proteinase Kallikrein nicht direkt, sondern indirekt durch Freisetzung von Mediatoren = Kinine wirkt, kommt eindeutig WERLE zu.

Bei Säugetieren und beim Menschen kommt die Kininogenase als Präkallikrein (Vorstufe) und als Kallikrein (freie, aktive Form) in Plasma, Pankreas, Parotis, Urin und Mundspeicheldrüsen vor. Im Plasma findet man das Enzym nur als Präkallikrein.

1.1.

Chemie des Kallikrein und der Kinine

Kallikrein gehört zur Gruppe der Peptidylpeptid-Hydrolasen. Von der Bausteinanalyse aus gesehen handelt es sich bei den verschiedenen Kallikreinen um Proteinmoleküle mit einem mittleren Molekulargewicht von ca. 34000; eine Ausnahme bildet das Plasmakallikrein, MG = 97000 (50). Die Anzahl sowie die Sequenz der Aminosäuren ist sehr ähnlich;

außerdem kommen in allen Kallikreinen einige Moleküle Glukosamin und Hexosen, in vielen, aber nicht in allen Molekülen, Galaktosamin vor.

Als Kinine bezeichnet man die zur Gruppe der Gewebshormone gehörenden biologisch aktiven Polypeptide, die nicht von bestimmten Drüsen sezerniert werden, sondern ubiquitär vorkommen. Zu ihnen gehören die Angiotensin-Gruppe, die Kiningruppe und die Hormone des Gastrointestinaltraktes.

1.2.

Wirkungen des Kallikrein und der Kinine

Allen Kallikreinen ist gemeinsam, daß sie Kininogen spalten. Sie zeichnen sich durch hohe Substratspezifität aus und unterscheiden sich durch den Ort, an dem sie ihr Substratmolekül angreifen. So spalten Organ- und Harnkallikrein zwischen Methionin und Lysin, während Plasmakallikrein und Trypsin zwischen Lysin und Arginin spalten (148).

Kallikrein, das über verschiedene Vorstufen entsteht, wirkt als Protease und setzt durch Spaltung zweier Peptidbindungen des Kininogens die vasoaktiven Kinine frei: das Nonapeptid Bradykinin und das Dekapeptid Kallidin (Abb. 1), wobei das Bradykinin nur durch Serumkallikrein und Trypsin, nicht aber durch Organkallikreine, freigesetzt wird.

Die Kallikreine aus Harn, Speicheldrüsen und Pankreas sind Isoenzyme, da das Dekapeptid Kallidin ihr gemeinsames Reaktionsprodukt darstellt (132).

Ferner zeigen alle Kallikreine eine esterolytische Wirkung, die vorwiegend gegen Ester des Arginins gerichtet ist (49).

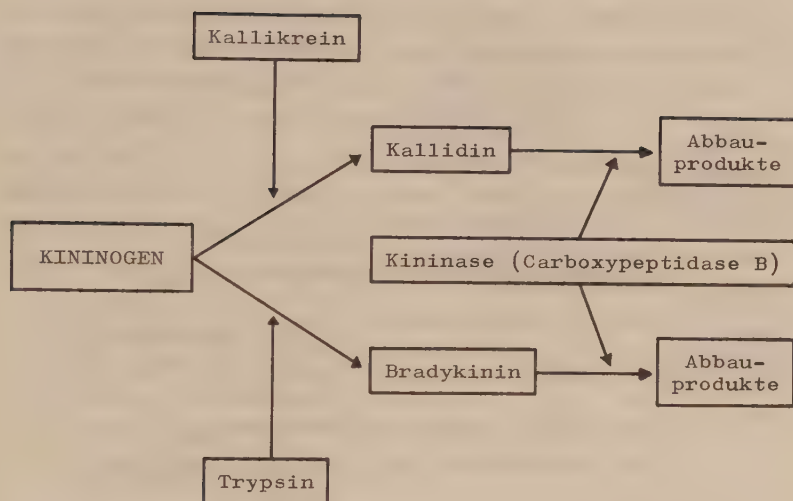


Abb. 1: Wirkung der Proteinasen Kallikrein und Trypsin auf das Kininsystem (modifiziert aus einer Trasylool-Informationsschrift der Fa. BAYER, Leverkusen).

Die Ursachen der Kallikreinaktivierung und -freisetzung können Traumen, Entzündungen, Toxinwirkungen und Schockarten verschiedenster Genese sein.

Alle diese Ereignisse führen im Blutplasma zur Umwandlung des inaktivierten in den aktivierten HAGEMAN-Faktor. Dieser wirkt sowohl auf die Blutgerinnung als auch auf die Fibrinolyse, so daß es zu einer Koppelung zwischen diesen beiden Systemen kommt. Außerdem bewirkt der aktivierte HAGEMAN-Faktor die Umwandlung von Präkallikrein in Kallikrein, das seinerseits zur Umwandlung von Kininogen in Kinin führt (Abb. 2).

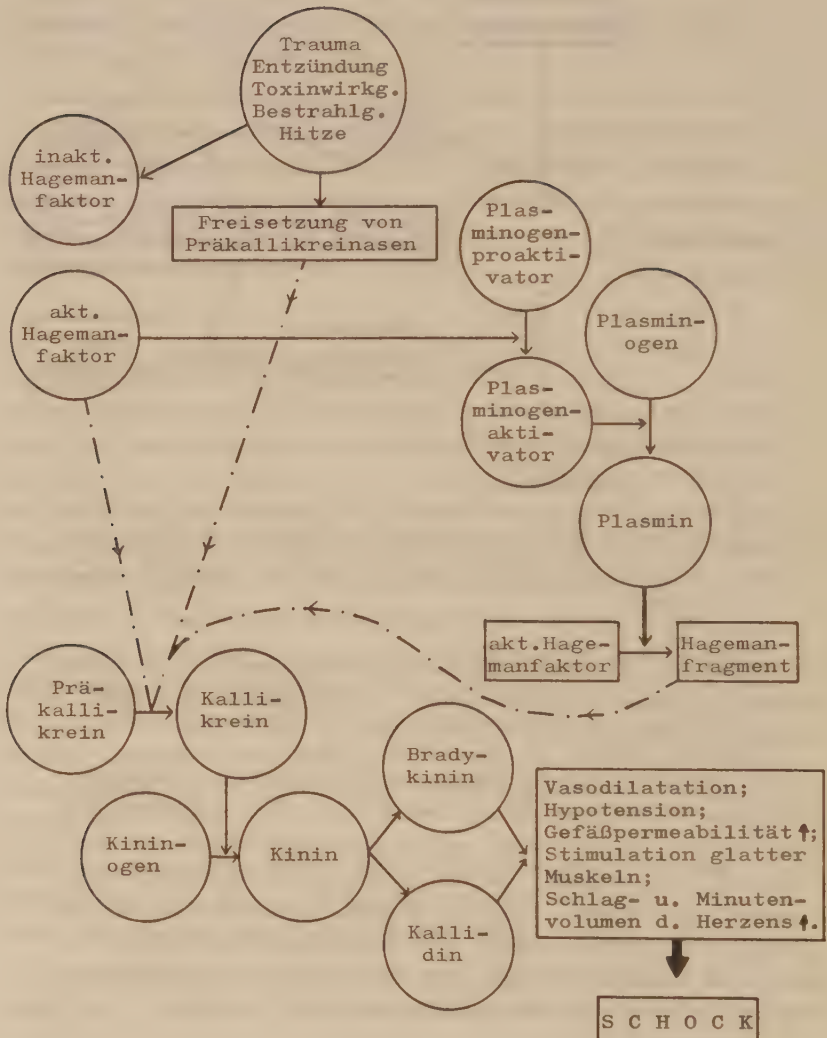


Abb. 2: Entstehungsmechanismus und Wirkungen der Kinine
(- · - · - · - : gilt als nicht gesichert)

Zu einer verstärkten und protrahierten pharmakologischen Wirkung der Kinine kann es durch Hemmung der Kininasen, z.B. durch Carboxypeptidase B,N und durch die im Serum vorkommenden Amino-peptidasen, kommen (146).

Die Bildung der Kinine kann über eine Hemmung des Kallikreins durch verschiedene Inhibitoren abgeschwächt oder verhindert werden.

Kinine haben folgende pharmakologische Wirkungen:

- periphere Vasodilatation und damit verbundene Blutdrucksenkung (100),
- Kontraktion glatter Muskeln von Uterus, Magen, Darm und Bronchien (129),
- Steigerung der Kapillarpermeabilität (115),
- Zunahme der Frequenz sowie des Schlag- und Minutenvolumens des Herzens.

Kinine können Leukozytenwanderungen auslösen (149) und wirken außerdem schmerzauslösend.

LEWIS (84) fand, daß Kinine alle Zeichen der Entzündung - rubor, dolor, tumor, calor, functio laesa - hervorrufen können.

Das Kininsystem steht in vielfältigen Wechselbeziehungen zu anderen Mediatorsystemen. In diesem Zusammenhang konnte LEWIS z.B. nachweisen, daß Bradykinin aus dem Nebennierenmark Katecholamine freisetzt. Es ist denkbar, daß diese Katecholamine zur Gegenregulierung der Kininwirkung dienen.

2

Geschichte und Entdeckung des Trasylol

Die Geschichte des Trasylol reicht wesentlich weiter als auf das Jahr 1953 zurück, in dem FREY und Mitarbeiter den Inhibitor in die Klinik einführten.

1929 entdeckte WERLE im Laboratorium von KRAUT einen Inaktivator für Kallikrein in Lymphknoten und Ohrspeicheldrüsen von Rindern. Bei seinen Untersuchungen über den Bildungsort des Kallikrein im Säugetierorganismus stieß er auf eine kleine Drüse (die sich später als Lymphknoten entpuppte), die mit dem Pankreas verbunden war, sich aber in Form und Konsistenz von ihm unterschied. Er nahm an, daß Kallikrein zuerst diesen Lymphknoten passieren müsse, um danach in inaktivierter Form ins Blut zu gelangen (152). Daraufhin extrahierte er solche Lymphknoten und konnte in den klaren Extrakten große Mengen Inaktivator nachweisen.

Später stellte WERLE fest, daß der Inaktivator auch in anderen Organen des Rindes, wie in Leber und Lunge, sowie in geringen Mengen auch in Geweben von Ziege und Schaf vorkommt, aber nicht identisch mit dem Serum-Inaktivator ist (142). Der sogenannte Drüseninaktivator - er erhielt später die Bezeichnung Trasylol - ist im Gegensatz zum Serum-Inaktivator niedermolekular und erwies sich als identisch mit dem von KUNITZ 1935 im Pankreas von Rindern nachgewiesenen basischen Trypsin-Inhibitor, was im Jahre 1965 und 1966 durch die Aufklärung der Aminosäuresequenz durch ANDERER und HÖRNLE (1) und LASKOWSKI sen. (70) bestätigt wurde.

Während das Kallikrein bereits sehr früh (1930) durch FREY in Zusammenarbeit mit der Firma BAYER in den Arzneischatz eingeführt wurde, ging die Entwicklung der Inhibitortherapie wesentlich langsamer vor sich. Dies ist verständlich, wenn man die beiden Gründe dafür bedenkt:

1. stellte die Isolierung und Reinigung des Inhibitors - zuerst aus Rinderparotis, später aus Rinderlungen - eine schwierige Aufgabe für die Biochemie dar, und

2. war anfangs über die pathogenetische Bedeutung von Proteinasen und ihrer Inhibitoren bei Krankheiten praktisch nichts bekannt.

Diese Kenntnislücke schloß sich nur langsam, indem über den experimentellen und klinischen Nachweis therapeutischer Wirkungen von Proteinaseinhibitoren der indirekte Schluß der pathophysiologischen Relevanz von Proteinasen gezogen werden konnte. Die wechselseitige Befruchtung und der Umfang der zugewachsenen Erkenntnisbereicherung läßt sich heute noch nicht abschließend beurteilen, da der Prozeß noch keineswegs abgeschlossen ist. Daß seine Bedeutung groß ist, steht jetzt bereits außer Zweifel ebenso wie die Tatsache, daß wir heute schon mehrere klare Inhibitorindikationen in der Therapie verzeichnen können.

Am Anfang dieser Entwicklung stand der mutige Versuch von FREY, KRAUT und WERLE, Trasylol bei der akuten Pankreatitis einzusetzen. In therapeutischer Hinsicht war dies der Ausgangspunkt für den Einsatz von Enzyminhibitoren in der Klinik. Die Ableitung dieser Indikation geht von der Vorstellung aus, daß dieses Organ besonders reich an Proteinasen ist (Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein u.a.) und angenommen werden konnte, daß die Aktivitäten dieser Enzyme, die in die Prozesse der Pankreatitis und der Pankreasnekrose eingreifen, durch die intravenöse Verabreichung von Drüseninaktivator gehemmt werden.

2.1.

Chemie des Trasylol

Trasylol ist ein basisches Polypeptid, bestehend aus 58 Aminosäuren und 4 Amidgruppen, mit einem Molekulargewicht von 6513 (Abb. 3).

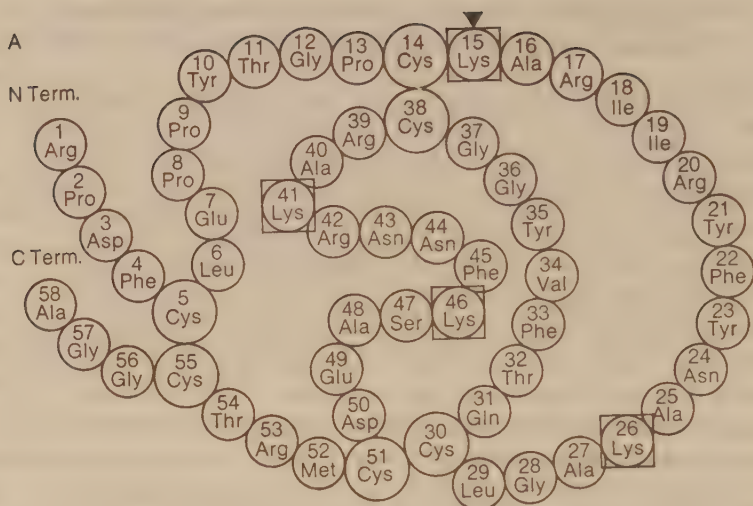


Abb. 3: Struktur des Trasylol
(Aus einer Trasylol-Informationsschrift
der Fa. BAYER, Leverkusen)

ACHER sowie LASKOWSKI sen. (22) und jun. konnten nachweisen, daß die freie Aminogruppe des Lysin-15-Restes für die Inhibitorwirkung gegenüber Trypsin von entscheidender Bedeutung ist. FRITZ und Mitarbeiter in München ermittelten, daß das auch für die Inhibition von Kallikrein und Chymotrypsin zutrifft (38).

Die Raumstruktur des Trasylol-Moleküls wurde 1970 durch HUBER ermittelt (Abb. 4). Danach ist das Molekül birnenförmig, und der Lysin-15-Rest befindet sich in einer etwas hervorragenden Stellung an der Spitze des Moleküls. Die exponierte Lage des reaktiven Zentrums und das hohe Dipolmoment sind wichtig für die schnelle und genaue Orientierung des Inhibitors zum aktiven Zentrum der hemmbaren Enzyme.

KASSEL (70) konnte zeigen, daß Trasylo1 durch Thermo-Lysin bei 60 - 80°C in verschiedene Peptide zerlegt wird.

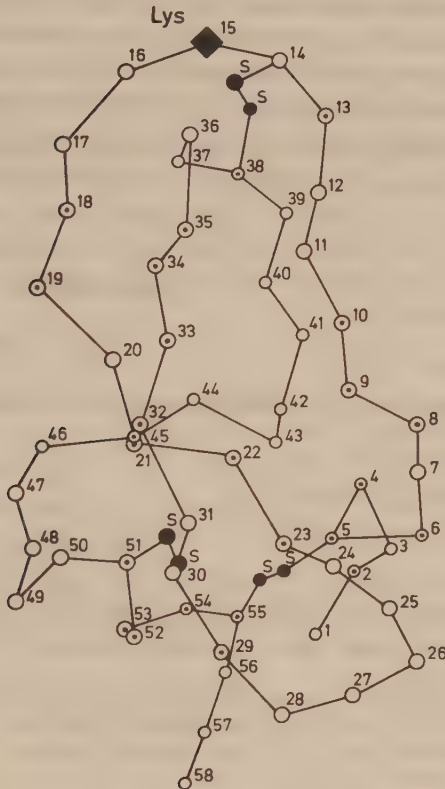


Abb. 4: Dreidimensionale Struktur des Trasylo1 mit seinem reaktiven Zentrum
(Nach Huber in : Neue Aspekte der Trasylo1-Therapie, Bd. 5, Schattauer-Verlag, Stuttgart 1972)

2.2.

Wirkungen des Trasylol

Die durch Trasylol hemmbaren Proteinasen haben eine proteolytische und esterolytische Wirkung. Zur Gruppe dieser Esteroproteinasen gehören außer den Kininogenasen (Kallikrein) das Trypsin, das Chymotrypsin, das Plasmin, der Plasminaktivator, die Plasmafaktoren in der Gerinnungsphase und die Gewebs- und leukozytären Proteinasen.

Über die Eingriffsmöglichkeiten des Trasylol in pathophysiologische Vorgänge läßt sich folgendes sagen: Alle Effekte, die durch das Trasylol zustandekommen, müssen auf die Hemmung, die diese Substanz auf die überschießende Freisetzung von Proteasen im Schockgeschehen ausübt, zurückgeführt werden.

Trasylol wirkt wie folgt:

1. antithromboplastisch (Verminderung der Hyperkoagulabilität), (13, 16, 98, 114);
2. antifibrinolytisch (90, 91);
3. permeabilitätssenkend (20);
4. antiödematös (vor allem bei Lungenödem), (15, 79, 85, 92);
5. zirkulationsfördernd (vor allem im Kapillarbereich), erweiternd auf das arterielle und verengend auf das venöse Gefäßbett und damit blutdrucksteigernd bzw. -stabilisierend (58, 72, 107);
6. erhöhend auf den Sauerstoffpartialdruck, verbessernd auf die Sauerstoffsättigung sowie vermindern auf die Wasserstoffionenkonzentration (109, 112);
7. senkend auf hohe Lipidwerte bis zum Normbereich (10, 54).

Außer Trasylol gibt es noch weitere Inhibitoren des Kinsystems; die wichtigsten dieser Hemmstoffe sind: der Serum-Inhibitor (154), der Sojabohnen-Inhibitor (36), das Leupeptin (139), das aus Aktinomyzetenkulturfiltraten isoliert wurde und das Helicin, das aus Weinberg-

schneckenextrakten gewonnen wird. Erwähnt werden soll auch ein weiterer neuer Inhibitor aus Seeanemonen, der in einer parallel laufenden Arbeit (123) untersucht wurde.

Abb. 5 zeigt, wo der Sojabohnen-, der Serum-, der Kallikrein-Trypsin-Inhibitor und die Carboxypeptidase in das Kallikrein-Kinin-System eingreifen. Die Angriffspunkte des Helicin, des Leupeptin und des Seeanemoneninhibitors sind in diesem Schema noch nicht enthalten, da ihr Wirkungsmechanismus noch diskutiert wird.

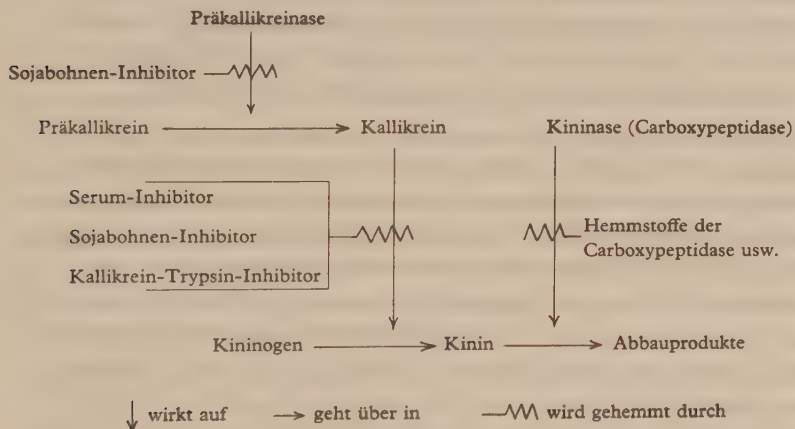
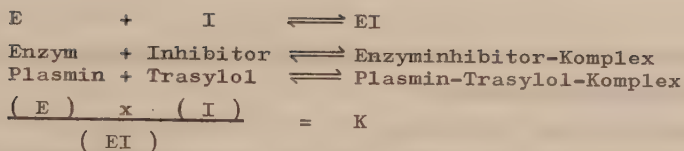


Abb. 5: Wirkungen verschiedener Proteinasen-Inhibitoren (aus: Das Kallikrein-Kininsystem, Enke-Verlag, Stuttgart, 1968)

Daß von all den erwähnten Inhibitoren nur das Trasylol im Arzneimittelschatz zu finden ist, liegt in der Verträglichkeit begründet. Aufgrund seines niedrigen Molekulargewichtes (MG 6512) ist die Verträglichkeit bei allen Spezies sehr gut. Die anderen genannten Inhibitoren besitzen ein wesentlich größeres Molekulargewicht und eine wohl in erster Linie hierauf basierende Toxizität, bedingt durch die Antigenwirkung höherer Eiweißmoleküle, die eine klinische Anwendung unmöglich macht. Die neuen Inhibitoren aus Schnecken und Mikroorganismen, die in den vorliegenden Versuchsergebnissen in ihrer tierexperimentellen Anwendung dargestellt werden, sind ähnlich dem Trasylol polyvalent und von niedrigem Molekulargewicht. Sie stellten so erstmals eine neue echte Alternative und Bereicherung im Arzneischatz dar, falls es gelingen sollte, sie auch beim Menschen einzusetzen.

Zu Punkt 2, S. 14, ist folgendes anzumerken: Die Hemmung der Fibrinolyse kommt durch die Plasmininhibition zustande. Eine Plasmininhibition steht der Auflösung von Mikrothromben (DIC) in der Endstrombahn entgegen. Es ist aber eine unbedingte therapeutische Notwendigkeit, die Mikrozirkulation von Fibrinablagerungen (= Mikrothromben) zu befreien, um so ein Offenhalten der Endstrombahn beim Schock zu gewährleisten. Folglich wäre die Hemmung des Plasmin und damit der Fibrinolyse durch das Trasylol (einer der stärksten Plasmininhibitoren) im Schock scheinbar völlig kontraindiziert.

Diesen Widerspruch scheint HABERLAND (48) aufgeklärt zu haben: Er geht davon aus, daß Enzym (= Plasmin) und Inhibitor (= Trasylol) einen reversiblen Komplex bilden. Die Reaktion erfolgt nach dem Massenwirkungsgesetz.



Dabei handelt es sich um einen Vorgang, der die Verschwendung des Enzyms mit nicht spezifischen Substraten verhindert, nachdem es durch ein Trauma im Überschuß in Freiheit gesetzt wurde. Normalerweise wird im Plasma diese Funktion von zirkulierenden Inhibitoren (z.B. α -Anti-Trypsin) erfüllt.

Der Inhibitor wird rasch eliminiert, und man erhält ein Puffersystem, das sicherstellt, daß die Aktivierung des Enzyms in dem Bereich bleibt, der für eine therapeutische Fibrinolyse notwendig ist.

Es handelt sich bei dem sogenannten antifibrinolytischen Effekt des Trasylo1 also nicht um eine reine Hemmung der Fibrinolyse, die kontraindiziert wäre, sondern um ein sinnvolles Bremsen der beim Schock überschießenden Plasminaktivierung. So wird einerseits verhindert, daß unphysiologisch viel Substrat (= Fibrin und Fibrinogen) abgebaut wird und andererseits, daß das Enzym (= Plasmin) durch diese unspezifischen Reaktionen vergeudet wird.

Zusammenfassend läßt sich diesbezüglich sagen, daß Trasylo1 weder ein reines Fibrinolytikum noch ein echtes Antifibrinolytikum ist. Zusammen mit dem Plasmin bildet es - durch die oben beschriebene pufferähnlich Wirkung - einen sinnvollen Bestandteil der beim Schock notwendigen fibrinolytischen Therapie.

3.

Entdeckung des Proteinaseninhibitors aus Weinberg-
schnecken (Helix pomatia)

Nachdem FRITZ und TSCHESCHE (37) 1971 beim Blutegel Trypsin-Plasmin-Inhibitoren gefunden hatten, entdeckten sie, angeregt durch MARX, in Zusammenarbeit mit DIETL, daß in wässerigen Extrakten der Weinbergschnecke bemerkenswert hohe Gehalte an Inhibitoren für die Enzyme Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kininogenasen vorhanden sind. Zwei Gruppen von Inhibitoren lassen sich durch ihre Hemmspektren, ihre chemischen Eigenschaften und ihre Molekulargewichte voneinander unterscheiden. Die Gruppe der niedermolekularen Inhibitoren, MG 6500, 58 Aminosäuren (136), zeichnet sich durch geringe Spezifität in der Hemmung aller genannten Enzyme aus sowie durch erhöhte Stabilität gegenüber Säure- und Hitze-Denaturierung. Durch Fällung mit Ammoniumsulfat können diese Inhibitoren von einem hochmolekularen Hemmstoff für die Enzyme Trypsin und Plasmin getrennt werden, der jedoch nur in der Eiweißdrüse der Schnecke vorkommt. Die niedermolekularen Inhibitoren finden sich in Fuß, Mantel und dem sezernierten Schleim der Schnecke. In den inneren Organen (Niere, Magen, Darmtrakt, Leber und Geschlechtsorgane) wurde keine nennenswerte Inhibitoraktivität gefunden.

3.1.

Isolierung des Proteinaseninhibitors aus Weinberg-
schnecken

Das zur Durchführung unserer Versuche benötigte Inhibitorpräparat wurde aus lebenden Schnecken gewonnen.

3.1.1.

Material und Methodik

3.1.2.

Schneckenmaterial

Um die möglichen Einflüsse des Winterschlafes auf den Inhibitorgehalt auszuschließen, verwendeten TSCHESCHE und DIETL je zur Hälfte Winterschnecken und sogen. Kriecherschnecken (die den Winterschlaf beendet hatten).

3.1.3.

Gewinnung des Rohextraktes

Von diesen Schnecken froren sie 2 kg ein. Nach Zertrümmerung und Entfernung der Gehäuse wurden die Weichteile bei 0 - 4°C mit destilliertem Wasser für 10 Min. homogenisiert. Die Suspension wurde für 1 Std. bei 24.000 x g zentrifugiert und der klare Überstand als Rohextrakt abgetrennt.

3.1.4.

Ammoniumsulfatfällung

Durch Fällung mit Ammoniumsulfat ließen sich bei 63% Sättigung aus dem Rohextrakt Hemmaktivitäten gegenüber Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein abtrennen, während im Überstand ein hochmolekularer Hemmstoff für Trypsin und Plasmin gelöst blieb. TSCHESCHE und DIETL stellten uns die Rohsubstanz in Form des Ammoniumsulfat-Präzipitates zur Verfügung, wofür wir uns an dieser Stelle bedanken.

3.1.5.

Bindung an Trypsinharz und Gewinnung des Inhibitors

Zur weiteren Reinigung des Rohinhibitors stellten wir ein

Trypsinharz her, wofür wir 5 g Harz einsetzten und so eine Bindungskapazität von 1,2 Mio. mIU erreichten.

Adsorptionschromatographisch läßt sich aus dem erneut gelösten Präzipitat der niedermolekulare Inhibitor gewinnen bzw. isolieren, indem der Inhibitor an das Trypsin reversibel gebunden wird, das seinerseits mit dem Harz verbunden ist. Auf diese Weise läßt sich der Inhibitor aus dem Gemisch entfernen bzw. von Begleitstoffen reinigen.

Gewaschen wurde das Trypsin-Inhibitor-Harz nach dem Batch-Verfahren (36), d.h. wir nahmen fünf Waschungen mit 0,1 M Triäthanolamin-Puffer und zwei Waschungen mit Aqua dest. vor, um eine möglichst niedrige Salzkonzentration des Harzes zu erreichen und dadurch die Umstellung auf einen niederen pH-Wert (1,7) zu erleichtern.

Zur Elution wird das Harz unter Pufferung mit KCl/HCl unter Zugabe von 1 n HCl und unter Kontrolle eines pH-Meters unter ständigem Rühren auf pH 1,7 eingestellt. Bei diesem pH löst sich die reversible Bindung des Inhibitors mit dem harzgebundenen Trypsin.

Die auf diese Weise gewonnene Inhibitor-Lösung wird durch Neutralisation und Rotations-Verdampfung in ein Inhibitorkonzentrat verwandelt, das sich durch Gel-Filtration an Sephadex-G-50 in das von uns verwendete Inhibitor-Präparat umwandeln läßt.

Die Ausbeute, ausgehend von 2 kg Schnecken, betrug 140 mg Inhibitor mit einer spezifischen Aktivität von 3.500 mIU/mg.

Abb. 6 gibt den Ablauf der Isolierungsprozedur wieder (136).

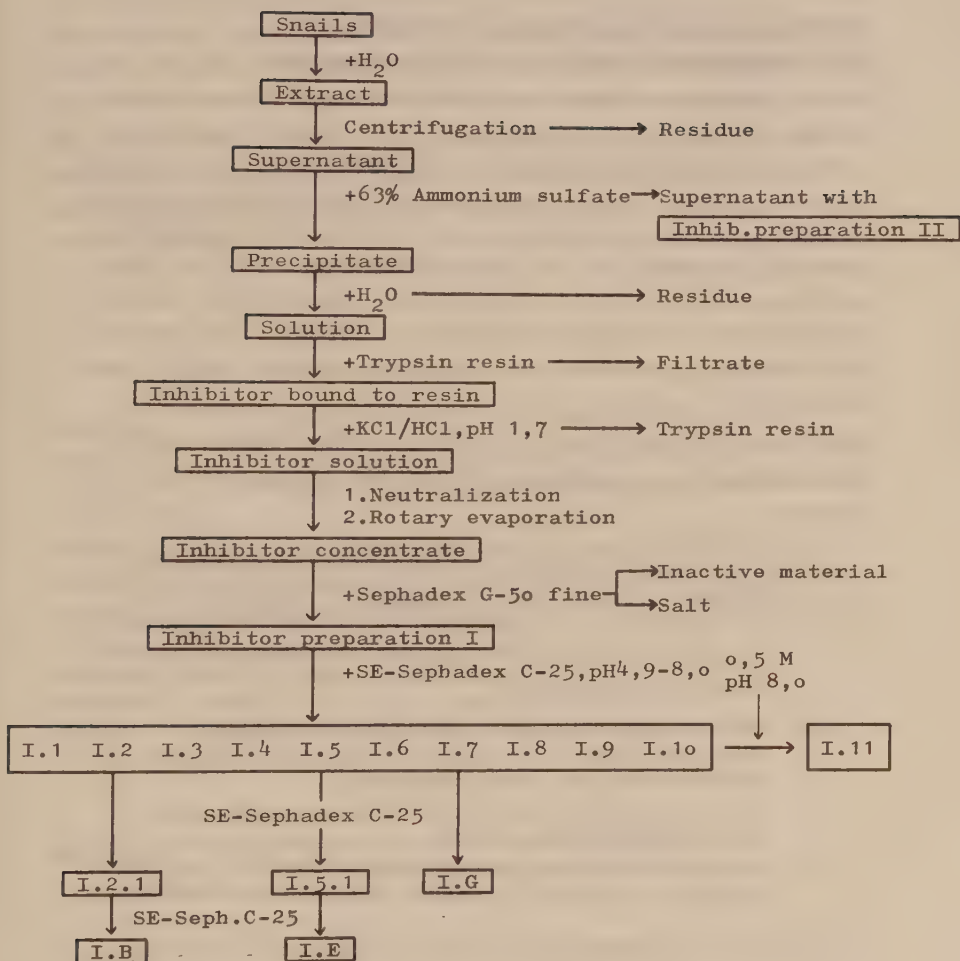


Abb. 6: Isolierungsprozedur des Schneckeninhibitors
(aus: Europ. Journal Biochem. 30, 1972)

3.2.

Chemische Eigenschaften und Wirkungen des Proteinaseninhibitors aus Weinbergschnecken

Durch Ionenaustauschchromatographie, die im Labor von TSCHESCHE und DIETL vorgenommen wurde, ließ sich das gewonnene Inhibitorpräparat in wenigstens 16 aktive Komponenten zerlegen. Davon konnten drei der aktivsten Hauptfraktionen rein dargestellt werden. Es sind Isoinhibitoren: Sie bestehen aus 58 Aminosäuren und haben ein Molekulargewicht von 6500. Alle drei Isoinhibitoren hemmen die Proteasen Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Organ-Kallikrein, allerdings mit unterschiedlicher spezifischer Aktivität.

Die Unterschiede dieser Isoinhibitoren zum polyvalenten Trypsin-Kallikrein-Inhibitor Trasylol bestehen in folgendem:

- 1) Sie sind unabhängig von der Vorinkubationszeit, d.h. sie erreichen innerhalb sehr kurzer Zeit (1 Min.) den maximalen Hemmgrad, während Trasylol dazu 20 Min. benötigt. In praxi bedeutet das, daß diese Inhibitoren die im Schockgeschehen entstehenden Proteasen sofort abfangen und inaktivieren können (137)
- 2) Sie besitzen ein breiteres Hemmspektrum.
- 3) Ihre Aktivität wird durch kurzzeitige Säure- und Hitzebehandlung nicht verringert.
- 4) Sie können auch durch hohe Salzkonzentrationen nicht inaktiviert werden.
- 5) Sie werden im Gegensatz zum Trasylol in der Niere nicht gebunden, sondern direkt ausgeschieden.

Diese drei Isoinhibitoren besitzen Arginin im aktiven Zentrum gegen Trypsin. Sie unterscheiden sich von den Inhibitoren, die von UHLENBRUCK, SPRENGER und ISHIYAMA (138) beschrieben wurden, dadurch, daß ihre Hemmspektren wesentlich begrenzter und definierter sind. Ferner sind die von UHLENBRUCK et al. nachgewiesenen Inhibitoren hochmolekular.

4.

Vergleich der Verteilung und Ausscheidung
der Proteinaseinhibitoren aus Rinderorganen (Trasylol)
und aus Weinbergschnecken (Helicin)

Die Verteilung des Trasylol im Organismus nach intravenöser Injektion wurde von mehreren Arbeitsgruppen untersucht (5, 9, 12, 33, 55, 67, 69, 133, 134, 147, 150, 151). Durch vergleichende Untersuchungen mit Inhibitoren, die bei ähnlicher Molekülgröße eine andere Hemmspezifität besitzen und weniger basisch sind als das Trasylol, sollte geklärt werden, warum dieser Inhibitor einige Zeit post injectionem selektiv in den Nieren fixiert wird. Im Labor von WERLE und FRITZ wurden dazu u.a. die Inhibitoren aus Weinbergschnecken (*Helix pomatia*) und Seeanemonen (*Anemonia sulcata*) verwendet.

FRITZ et al. (35) ermittelten durch Tierversuche, daß nach intravenöser Injektion des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors aus Rinderorganen die Konzentration im strömenden Blut relativ rasch abnimmt, um - zeitlich etwas verzögert - in den Nieren stark anzusteigen, wie es aus Abb. 8 ersichtlich ist.

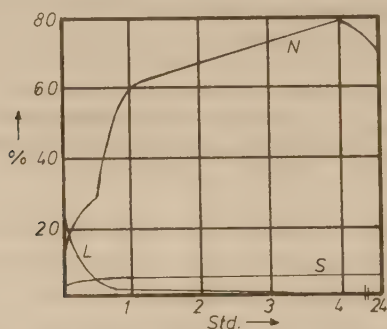


Abb. 8: Konzentration von Trasylol in Nieren = N,
Leber = L, Serum = S nach i.p.-Injektion
(aus: Z.Physiol.Chem. 350, 1969)

1 Std. nach der Injektion wurden bereits 60%, 4 Stdn. danach 80% der injizierten Inhibitormenge in den Nieren gefunden. In diesem Organ wird der Inhibitor im Laufe von Tagen langsam inaktiviert: nur bis zu 2% der injizierten Inhibitormenge werden in aktiver Form mit dem Harn ausgeschieden. 3% bis 6% der injizierten Aktivität sind in der Leber über einen längeren Zeitraum hinweg nachzuweisen.

In Abb. 9 ist die im Organismus der Ratte zu den angegebenen Zeitpunkten insgesamt wieder auffindbare Inhibitoraktivität angegeben.

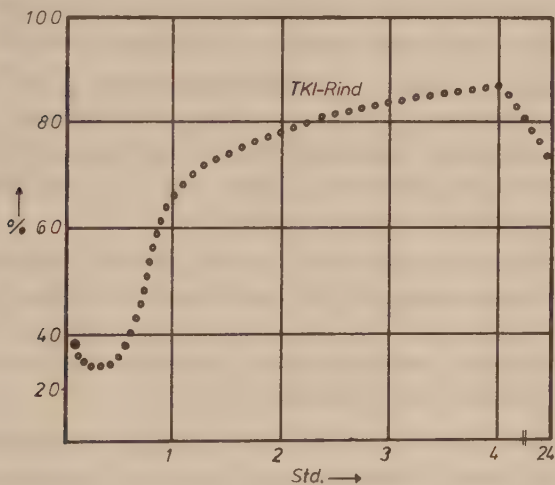


Abb. 9: Prozentsatz der in Organen von Ratten insgesamt wieder auffindbaren Inhibitoraktivität
(aus: Z.Physiol.Chem. 350, 1969)

Die hohen Ausbeuten sind dabei hauptsächlich auf die Fixierung des Inhibitors in den Nieren zurückzuführen. In Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen bei Ratten und Hunden sinkt auch beim Menschen die Inhibitor-

Konzentration im Blut relativ rasch ab, so daß 10 Min. nach der Injektion nur noch ca. 8% des Trasylol im Blut nachweisbar sind. Mit dem Harn werden nur 1,5% der injizierten Aktivität ausgeschieden.

Aus den Kurven der Dissertationsarbeit von SCHORP (126), Abb. 10, geht hervor, daß die Konzentration des Inhibitors aus Weinbergschnecken im Serum ebenfalls rasch abnimmt und zeitlich etwas verzögert im Harn ansteigt. Der wesentliche Unterschied zwischen Trasylol und dem Schneckeninhibitor liegt darin, daß von dem aus Schnecken gewonnenen Hemmstoff nach 5 Stdn. p.i. nur 3%, nach 12 Stdn. p.i. 0% in den Nieren gefunden werden, während beim Trasylol 2 Stdn. p.i. bereits 80% in den Nieren nachweisbar sind und erst im Laufe von Tagen langsam inaktiviert werden.

Der Vollständigkeit halber sei gegenübergestellt, daß 3% bis 6% der injizierten Aktivität des Trasylol in der Leber über einen längeren Zeitraum nachweisbar sind, während der Schneckeninhibitor bereits 3 Stdn. p.i. in der Leber nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

Aus diesen Untersuchungsergebnissen geht hervor, daß die Nieren das Eliminationsorgan für das Trasylol darstellen, wobei der Inhibitor nicht mit dem Harn ausgeschieden, sondern in den Nieren in mehreren Tagen, wahrscheinlich durch proteolytischen Abbau, inaktiviert wird.

Im Vergleich dazu wird der Schneckeninhibitor direkt über die Nieren, d.h. ohne Fixierung, mit dem Harn ausgeschieden, ohne vorher inaktiviert zu werden.

Der Grund für die selektive Fixierung des Trasylol ist nach den Ergebnissen der Arbeit von FRITZ et al. (35) die stark positive Ladung dieses Inhibitors, dessen isoelektrischer Punkt bei pH 10,5 liegt. Der I.E.P. des Schneckeninhibitors liegt erheblich niedriger, was bewirkt, daß es bei ihm nicht zu einer Fixierung in den Nieren kommt.

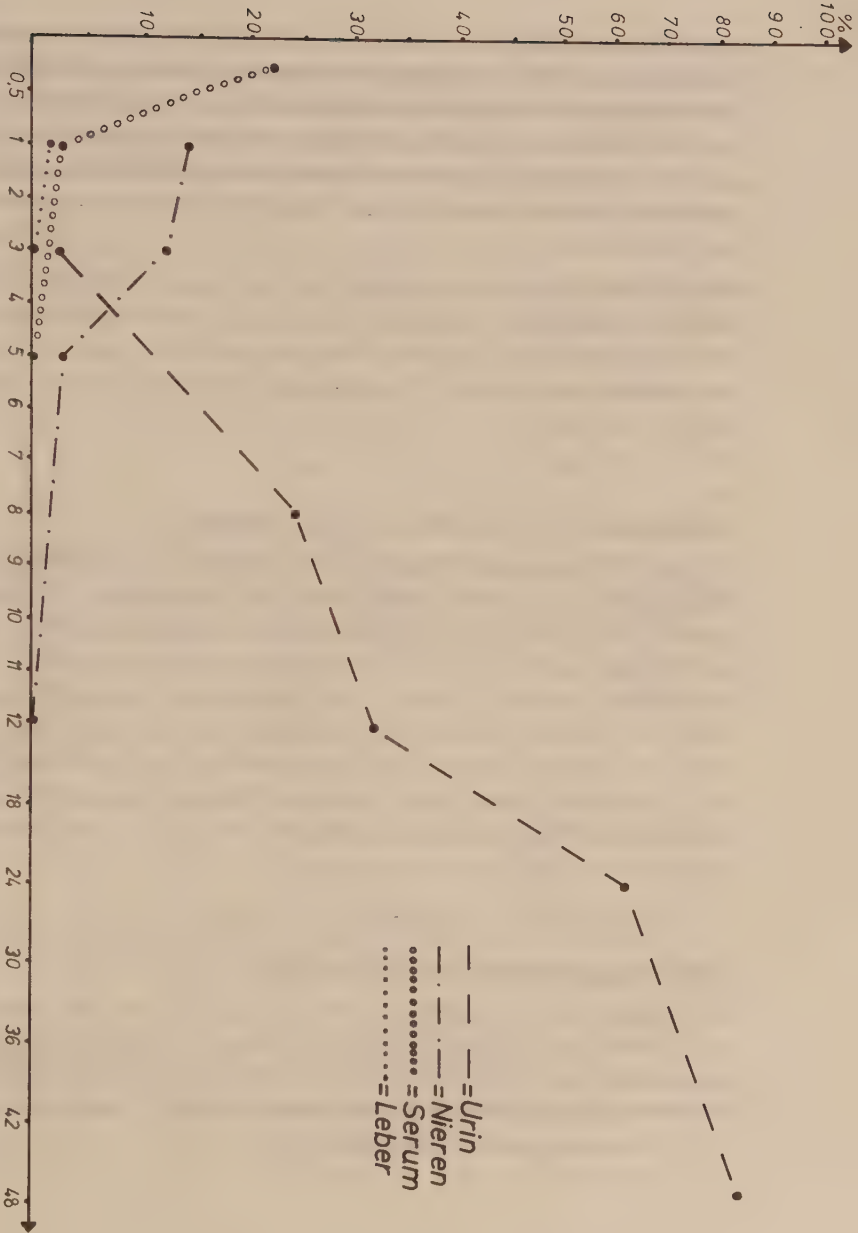


Abb. 10: Verteilung des Schneckeninhibitors in Serum, Nieren, Leber und Urin bei Ratten (126)

Die Tatsache, daß der Schneckeninhibitor nicht in den Nieren gebunden wird und dadurch weder nierentoxisch noch in größerem Maß stoffwechselerändernd wirken kann, ist sicher als Positivum zu bewerten. Unsere Verbrühungsversuche haben gezeigt, daß er im Tierexperiment zumindest als genauso wirksames Schocktherapeutikum eingesetzt werden kann wie das Trasylol.

Ob der neue Inhibitor aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften gegenüber Trasylol (s.S.14) zu bevorzugen ist, muß durch weitere umfangreiche Forschungsarbeit, zu der wir mit den Ergebnissen unserer Experimente den Anstoß geben wollen, geklärt werden.

5.

Entdeckung des Leupeptin und des Antipain

1965 gab der Japaner UMEZAWA, der primär an der Entwicklung neuer Antibiotika arbeitete, der Forschung der Enzymhemmung neue Impulse: Er leitete die Untersuchung von Enzyminhibitoren ein, die er in Kulturfiltraten von Mikroorganismen entdeckt hatte. Diese Arbeiten führten schließlich zur Isolierung und Herstellung von folgenden Inhibitoren: Leupeptin, Antipain, Chymostatin und Pepstatin. Da sich in erster Linie das Leupeptin in zahlreichen biochemischen Tests als wirksamer Hemmstoff erwies, soll nur es in diesem Rahmen behandelt werden.

5.1.

Chemie und Wirkungen des Leupeptin

Verglichen mit den Inhibitoren von proteolytischen Enzymen tierischen und pflanzlichen Ursprungs, die Polypeptide makromolekularer Natur sind und fast alle Molekulargewichte über 5000 haben (Ausnahme: Renin) (113), ist Leupeptin eine niedermolekulare Verbindung.

Leupeptin ist der Name einer Gruppe von Streptomycetenprodukten, die Proteasen inhibieren. Es wurde in Kulturfiltraten von verschiedenen bekannten Streptomycetenarten - *Str. roseus*, *Str. roseochromogenes*, *Str. chartreusis* u.a.m. - gefunden, als man diese Arten bezüglich ihrer Hemmeigenschaften gegenüber Trypsin und Plasmin untersuchte.

Das Leupeptin hat folgende Formel und kommt in drei Strukturen vor:

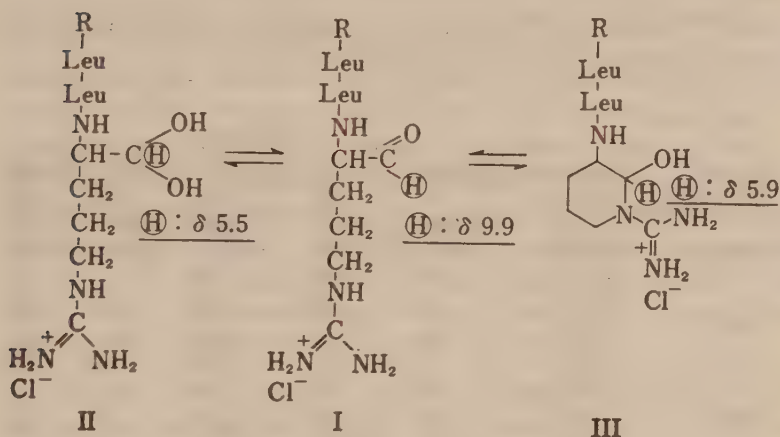


Abb. 11: Strukturformeln des Leupeptin (aus: Enzyme inhibitors of microbial origin, University Park Press, Tokyo, 1972)

Struktur II und III sind in gleichen Mengen vorhanden, während Struktur I nur in Spuren vorkommt (139).

UMEZAWA et al. konnten beweisen, daß das Arginal entscheidend für die Aktivität des Leupeptin ist.

Die Wirkungen des Leupeptin auf Thrombokinase, Thrombin, Plasmin, Trypsin, Papain, Kallikrein und α -Chymotrypsin wurden nach bekannten Methoden untersucht (2). Dabei wurde festgestellt, daß Leupeptin folgende Reaktionen stark hemmt:

1. die Thrombokinase-reaktion,
2. die Fibrinogenolyse und die Fibrinolyse durch Plasmin,
3. die Proteolyse durch Trypsin.

Es zeigte eine schwächere Hemmung gegenüber der Esterolyse durch Plasmin, Trypsin und Kallikrein.

Abb. 12 zeigt die Unterschiede zwischen Leupeptin und anderen Agentien in der Enzymhemmung (139).

Enzyme	Substrates	ID ₅₀ (µg/ml)				
		Leupeptin	ϵ -ACA ¹⁾	<i>t</i> -AMCHA ¹⁾	Try-Inh.	Trasylo ¹⁾
Thrombokinase	Plasma	15	> 500	> 500	19.2	> 500
Thrombin	TAME ¹⁾	10,000	> 10,000	> 10,000	> 1,000	> 200
	BAEE ²⁾	12,000	> 10,000	> 10,000	> 1,000	> 1,000
Plasmin	Fibrinogen	8	1,000	170	4	3
	Fibrin	6	500	100	5.7	3
	Casein	16	2,250	500	5	10
	TAME	85	4,500	1,000	80	15
Trypsin	Casein	2	> 1,000	> 1,000	0.5	2.5
	Hemoglobin	3.6	> 500	> 500	2	-
	BAA ³⁾	0.1	> 200	> 200	1.8	5
	TAME	65	> 10,000	> 10,000	2	20
	BAEE	80	> 10,000	> 10,000	2.5	30
Papain	Casein	0.5	> 5,000	> 1,000	> 1,000	54
	Hemoglobin	0.15	> 500	> 500	> 500	> 500
	BAA	0.05	> 200	> 200	> 1,000	84
Kallikrein	BAEE	75	> 10,000	> 10,000	> 1,000	6
α -Chymotrypsin	Casein	> 500	> 5,000	> 2,500	100	5.5
	ATEE ⁴⁾	> 2,500	> 20,000	> 10,000	350	50

Abb. 12: Gegenüberstellung verschiedener Enzyminhibitoren (aus: Enzyme inhibitors of microbial origin, University Park Press, Tokyo, 1972)

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß Leupeptin stärker den proteolytischen als den esterolytischen Effekt hemmt. Die Hemmung der esterolytischen Aktivität des Kallikrein durch das Leupeptin deutet darauf hin, daß es auch eine starke inhibitorische Wirkung auf den proteolytischen Kallikreineffekt ausübt, was durch Untersuchungen von FRITZ, FÖRG-BREY und UMEZAWA bestätigt wurde (39). Sie ermittelten, daß sowohl Leupeptin als auch Antipain eine starke Hemmwirkung auf die akrosomale Spermienproteinase (Eberakrosin) und die Kallikreine aus Schweineorganen (Pankreas, Submandibularis-Drüsen, Harn) ausübt.

Besonders bemerkenswert ist der Einfluß des Leupeptin - über die Hemmung der Thrombokinasereaktion - auf die Blutgerinnung. UMEZAWA und Mitarbeiter stellten fest, daß Leupeptin die Blutgerinnung bei Menschen und Kaninchen hemmt, nicht aber die Gerinnung von Mäuse-, Ratten- oder Hundeblut. Oral appliziertes Leupeptin wird gut resorbiert. So fand man bei einer Gabe von 1 g/kg nach 2 Stdn. 200 g/ml im Serum. Die Urinausscheidungsrate zeigte, daß 25% der Oral-dosis absorbiert wurden. Die Konzentration des Leupeptin im Serum und im ausgeschiedenen Urin in Beziehung zur Zeit wird durch Abb. 13 verdeutlicht (139).

In höheren Dosen wirkt Leupeptin toxisch. Die Letaldosis für Ratten lag bei 125 mg/kg i.v. oder einer größeren Menge als 4.000 mg/kg s.c. oder oral.

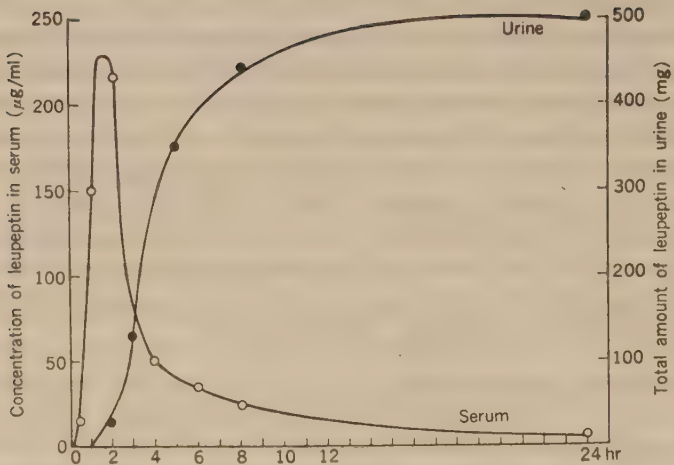


Abb. 13: Verteilung des Leupeptin in Serum und Urin
(aus: Enzyme inhibitors of microbial origin,
University Park Press, Tokyo, 1972)

Die Hemmung von Trypsin und die Hemmung der Kininbildung durch Leupeptin fordern beinahe dazu auf, es bei Pankreatitis oder zur Behandlung von Verbrennungen, hervorgerufen durch Hitze- oder Strahleneinwirkung, einzusetzen. Leupeptin-Salbe verhindert Blasenbildung und Schmerzen, wenn sie sofort nach dem Trauma aufgebracht wird, was darauf hindeutet, daß Leupeptin die Kininbildung inhibiert. Als klinisch erwiesen gilt, daß Leupeptin Verbrennungen, die durch Strahlen entstehen, verhindern kann. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, daß es eine Hemmwirkung auf die Tumorgenese hat, die in der Mäusehaut durch 7,12-Dimethylbenzanthracen und Krotonöl experimentell hervorgerufen wird (135). Außerdem hat das Leupeptin bei oraler Gabe von 100 mg/kg einen starken antiödematösen Effekt, wie aus Abb. 14 hervorgeht (139).

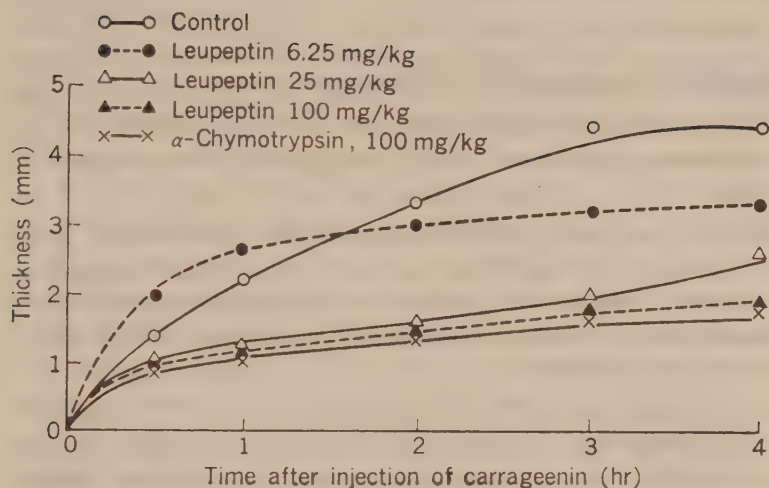


Abb. 14: Antiödematöse Wirkungen des Leupeptin und des α -Chymotrypsin (aus: Enzyme inhibitors of microbial origin, University Park Press, Tokyo, 1972)

Beim durch Carrageen (Extrakt aus gleichnamigem irländischen Moos) induzierten Ödem zeigte sich, daß die in Abb. 14 angegebene Leupeptindosis in der Lage war, das Ödem in nahezu gleichem Maß zu hemmen wie das α -Chymotrypsin.

C

DIE VERBRENNUNGSKRANKHEIT

6.

Pathophysiologie des Verbrühungsschocks

Infolge größerer Hautläsionen durch Verbrennungen bzw. Verbrühungen kommt es in der Klinik noch immer zu Todesfällen.

LEVENSON und LUND (82) errechneten für Nordamerika, daß 10.000 Krankenbetten täglich von Verbrennungskranken belegt sind. MOYER (97) schätzt die jährlich in Amerika zur Behandlung von Verbrannten bereitgestellten Betten auf 4 bis 6 Millionen.

Trotz dieser großen Patientenzahlen und der sich damit aufzeigenden Gesetzmäßigkeiten im Krankheitsablauf kommt die Therapie der Verbrennungskrankheit nur mühsam voran.

Während des ersten Weltkrieges waren die Überlebenschancen für Patienten mit 50%iger Verbrennung der Körperoberfläche sehr gering. Heutzutage stieg die Überlebensrate auf 50% bei Patienten im Alter von 16 bis 32 Jahren; zweifellos ein Erfolg der Plasma- und Elektrolytsubstitutionstherapie sowie der Anwendung von Antibiotika.

Wie man den Mortalitätsstatistiken jedoch entnehmen kann, fiel die Todesrate in den letzten 25 Jahren nur um 5% ab. Viele Forscher glauben deshalb, daß man bei Verbrennungen an einem Endpunkt der Therapiemöglichkeiten angelangt ist (BACK, WILKENS, 6).

Wesentliche Fortschritte in der Therapie von Verbrennungsverletzungen wurden erst erzielt, als man erkannte, daß die Hautverbrennung nicht nur einen örtlichen Schaden darstellt, sondern eine Wirkung auf den Gesamtorganismus auslöst, den man mit dem Begriff Verbrennungskrankheit beschrieb (7, 141).

6.1.

Burn Syndrom

Eine durch thermische Überhitzung ausgelöste Gewebsschädigung setzt eine Kettenreaktion krankhafter Vorgänge in Gang, von ARTURSON (3) auch als Burn Syndrom bezeichnet. Dieses Syndrom wird vor allem verursacht durch starke Flüssigkeitsverschiebungen qualitativer und quantitativer Art. Die hierbei auftretenden Symptome lassen sich in drei zeitlichen Phasen aufzeigen:

1. Phase:

In der ersten Phase, d.h. in den ersten 48 Stdn., kommt es durch verletzte Gefäße und Ansteigen der Kapillarpermeabilität zu einer starken Flüssigkeitsverschiebung und somit zu einer akuten zirkulatorischen Insuffizienz, wovon das ganze Organsystem betroffen ist. Zahlreiche Organe scheinen gebläht, ödematös und mit unzähligen Hämorrhagien durchsetzt zu sein. Es kommt zu Lungenödemem (128), Nierenrindennekrosen mit Olig- oder Anurien (3, 62), Leberschäden (105, 153), Gastrointestinalulcerationen (25, 29) und Gehirnödemen (29, 65).

2. Phase:

Am 3. bis 8. Tag, also in der 2. Phase nach der Schädigung, stellen sich durch die bereits bestehende veränderte Körperflüssigkeitsverteilung und -zusammensetzung Eiweiß- und Elektrolytverluste ein. Begleitet durch Infekte entstehen in dieser Phase degenerative Veränderungen an den Organen.

3. Phase:

In der 3. Phase, während der 2. Woche nach der Verbrennung, kommt es zu größeren Organatrophien mit beginnender fibrotischer RepARATION vor dem Hintergrund einer Stoffwechselentgleisung, Infektion und allgemeinen Erschöpfung.

Im Rahmen dieser Arbeit beschränken wir uns in der Beschreibung der Pathophysiologie des Verbrühungsschocks auf den ersten zeitlichen Abschnitt nach dem thermischen Trauma. In dieser Phase laufen im Organismus die Reaktionen ab, die durch den Proteinaseinaktivator Trasylol günstig beeinflußt werden können.

6.2.

Lokales Geschehen

Die lokalen Folgen der Hitzeeinwirkung manifestieren sich in der Verbrennungswunde. Die Reaktionen der Haut auf den thermischen Schaden sind

1. die direkte Gewebsschädigung,
2. die Entzündungsreaktion.

Wichtig ist die Feststellung, daß die morphologischen und biochemischen Veränderungen, die bei der direkten Gewebsschädigung auftreten, abhängig sind von der Zeitdauer und der Temperatur der Hitzeeinwirkung. An der Hautoberfläche führen bereits Temperaturen von 70°C bei einer Einwirkungszeit von weniger als 1 Sekunde zur epidermalen Nekrose. Je nach Dauer und Art der Temperatureinwirkung reicht sie unterschiedlich tief. Die Haut und ihre Anhangsgebilde sowie die darunterliegenden Gefäße können ihre Funktion nicht mehr wahrnehmen. Strukturprotein wird koaguliert, ganze Zellschichten werden zerstört; im weiteren Bereich gehen wichtige Zellstrukturelemente zugrunde.

Es kommt zur Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen, die nun den extrazellulären Raum überschwemmen und das homöostatische Gleichgewicht stören: Elektrolyte, vor allem das intracelluläre Kalium, die das Gleichgewicht des Salzhaushaltes beeinträchtigen; Eiweißbruchstücke, die den osmotischen Druck erhöhen und saure Stoffwechselprodukte, die den pH-Wert verschieben.

6.2.1.

Permeabilitätsschädigung der Kapillaren

Die Gefäße reagieren mit einer erhöhten Permeabilität der Kapillarmembranen und Venolen sowie einer Konstriktion der Arteriolen, was den wichtigsten Aspekt der Entzündungsreaktion nach einer Verbrennung darstellt: aus dem intravasalen Raum tritt Plasma in den Extrazellulärraum. Die kolloidosmotische Druckdifferenz zwischen kapillärem Plasma und dem Extrazellulärraum ist durch diese zwei Pathomechanismen praktisch aufgehoben.

Die Erhöhung der Kapillarpermeabilität im verbrannten Gewebe zeigten KING, REYNOLDS und PRICE (73) mit der Verteilung von Evans-blue (T-1824) in diesem Gebiet. Dabei sind das an der Körperoberfläche erscheinende Exsudat und Ödem nur ein Bruchteil des Gesamtverlustes an Körperflüssigkeit, während gleichzeitig in den Geweben ein wichtigerer und größerer Verlust stattfindet, der zunächst unsichtbar bleibt und erst später als typisches Verbrennungsödem erkennbar wird. Im Gegensatz zu früheren Auffassungen neigt man heute zu der Annahme, daß die veränderte Kapillarpermeabilität nicht nur auf das verbrannte Gebiet beschränkt bleibt, sondern auch fernab von der Verbrennung auftritt und dort ebenso zu Ödemen führt.

Der oft enorme Flüssigkeitsverlust von mehreren Litern hält im allgemeinen für 48 Stdn. an, wobei die Hälfte davon bereits in den ersten 6 bis 8 Stdn. aus dem Kreislauf verlorengeht.

Die Flüssigkeit kann sich an der verbrannten Oberfläche oder aber auch subkutan sammeln. An der Oberfläche kommt es zur Entstehung von Blasen, die man bei der Trennung der Epidermis von der Dermis beobachten kann. Die subkutane Ödembildung findet sich besonders dann, wenn die

Hautoberfläche koaguliert ist. Bei schweren Verbrennungen entwickelt sich das subkutane Ödem sehr schnell, und es kommt zu einer Stase in den Kapillaren.

Durch Blutvolumenbestimmungen konnte festgestellt werden, daß Volumenverluste schon unmittelbar nach dem Verbrennungstrauma einsetzen. Bereits 1 bis 2 Stdn. nach dem Trauma kommt es in Abhängigkeit des Ausmaßes der Verbrennung zu einer 15 bis 30%igen Abnahme des zirkulierenden Blutvolumens. Daraus zeigt sich, daß die ersten 4 bis 6 Stdn. von entscheidender Bedeutung für die Therapie sind: Ödembekämpfung und Verhinderung eines intravasalen Volumendefizits sind ausschlaggebend für Ausmaß und Schwere der Verbrennungskrankheit und für ein Überleben des Patienten.

Das sehr schnell entstehende initiale Ödem beruht auf einem Verlust von intravasaler Flüssigkeit in das extravasale Gewebe. Verantwortlich dafür sind:

1. erhöhter Filtrationsdruck,
2. erhöhte osmotische Kräfte im Gewebe (Zellzerfall),
3. starke Permeabilitätserhöhung der Gefäße.

Dabei ist der erhebliche Verlust von osmotisch wirksamem Albumin wesentlich entscheidender als der des höhermolekularen Globulins: die kolloidosmotische Druckdifferenz wird aufgehoben. Zusätzlich treten korpuskuläre Elemente aus wie Granulocyten, Lymphocyten, Monocyten und Erythrocyten. Der Sinn dieser Prozesse liegt in der Einleitung reparativer Vorgänge: dem Abtransport und der Hemmung toxischer Stoffwechselprodukte, der freiwerdenden Enzyme und der Mobilisierung der zur Phagocytose befähigten Zellen und solcher, die zur Neubildung von Gewebe fähig sind.

Die Ursache und die genaue Lokalisation der Permeabilitätserhöhung für höher molekulare Stoffe und korpuskuläre

Elemente stehen im Mittelpunkt vieler sich widersprechender Untersuchungen. Einerseits wird der Nachweis geführt, daß nur die direkte Schädigung des Gefäßendothels für die Permeabilitätserhöhung verantwortlich ist; andererseits werden verschiedene gefäßaktive Stoffe diskutiert, die auf Arteriolen, Kapillaren und Venolen wirken (100, 115).

Die zahlreichen sich widersprechenden Thesen spiegeln die Komplexität der sich abspielenden Vorgänge wieder. Darüber hinaus sind weder die strukturellen noch die biochemischen Grundlagen zur Lösung dieser Fragen ausreichend geklärt.

Die Tatsache, daß es bei der Verbrühung zu einem ubiquitären Ödem kommt, beweist indirekt, daß den vasoaktiven Pharmaka bei der Permeabilitätserhöhung eine zentrale Rolle im pathophysiologischen Geschehen zukommt. Eine kausale Therapie müßte die Wirkung dieser Substanzen aufheben oder ihre Freisetzung verhindern.

6.2.2.

Angriffspunkte der vasoaktiven Stoffe

Für den Organismus stellt die Gefäßwand im weitesten Sinne die Austauschfläche zwischen dem Intravasalraum und dem Extrazellulärraum dar. Die Funktion dieser Austauschfläche ist abhängig von der Gefäßwandstruktur, dem Gefäßinhalt und dem Extrazellulärraum. Regulierend auf diese Austauschfläche wirken viele gefäßaktive Stoffe, teilweise indirekt durch Freisetzung über das Nervensystem, teilweise direkt im Sinne einer Autoregulation (Abb. 15). Sie beeinflussen in der Regel die Weite und Durchlässigkeit der Endstrombahn. In extrem hoher Dosierung erhöhen sie sogar die Permeabilität für makromolekulare Substanzen, nicht dagegen für Blutzellen.

1. *Einfluß auf das vegetative Nervensystem*
Überträgersubstanzen und rezeptorenwirksame Substanzen

Parasympathikomimetika	Azetylcholin
Sympathikomimetika	Adrenalin
	Noradrenalin
Parasympathikolytika	Atropin
Sympathikolytika	α -Rezeptorenblocker: Dibenzamin, Phenoxybenzamin, Sekale-Alkaloide, Tolazoline, Phentolamin, Azapetine
	β -Rezeptorenblocker: Proteranol, Promethalol, Propranolol
β -Rezeptorenstimulatoren	Isopropylnoradrenalin, Nylidrine, Isosuprin
Antiadrenerge Substanzen	Guanethidine, Rauwolfia-Alkaloide, Methyldopa
Zentral wirksame Substanzen	Imidazolin, Rauwolfia-Alkaloide
2. *Direkten Einfluß auf das Erfolgsorgan*

Biogene Amine	Histamin
	Nukleotide
Polypeptide	Vasopressin
	Angiotensine
	Kinine
Prostaglandine	Prostaglandin E_1 , E_2 , E_{22}
3. *Substanzen mit ungeklärtem Wirkungsmechanismus*

Isocholininderivate
Nikotinsäurederivate
Dipyridamole
Hydralazine

Abb. 15: Steuerung der Austauschfläche (aus: Generalisierte intravasale Gerinnung, Schattauer-Verlag, Stuttgart, 1971)

Korpuskuläre Elemente treten erst nach einer Schädigung der Basalmembran durch die Gefäßwand in das Interstitium. Nur bei pathologischen Prozessen, wie z.B. bei der Verbrühung oder der Pankreatitis, werden Stoffe freigesetzt, die dazu fähig sind, die Basalmembran zu verändern. Dazu gehören:

1. die Amine Histamin und Serotonin,
2. die Polypeptide Bradykinin und Kallidin,
3. die Proteasen Kallikrein, Plasmin, Globulin-Permeabilitäts-Faktor, Trypsin, Phospholipase, Kollagenasen und Hydrolasen,
4. verschiedene Mediatoren wie Lysolecithine und Pyrogene.

Einen erheblichen Teil der heutigen Kenntnisse über die Angriffspunkte dieser Stoffe verdankt man der Elektronenmikroskopie. Bei vereinfachter Betrachtung besteht die Wandung der Kapillaren und Venolen aus zwei Bauelementen: einer meist kontinuierlichen Schicht von mechanisch labilen Endothelzellen, die dem stabilisierenden Halteapparat, bestehend aus Basalmembran und umgebenden Fibrillen, aufgelagert sind. Hauptsächlich studierte man die Ablagerung von Partikeln in verschiedenen Gefäßarealen. Sie treten meist aus dem Endothelrohr aus, wahrscheinlich durch interzellulär gelegene Spalten und Poren. Die darunterliegende Basalmembran fängt die Partikel ab und wird so markiert. Gegenüber Plasmaproteinen kommt der vaskulären Basalmembran keine Schrankenfunktion zu; Tusche wird jedoch zurückgehalten, so daß man die Basalmembran als Grobfilter bezeichnen kann.

Das Feinfilter dürfte für Plasmaproteine durch die Endothellage repräsentiert sein. Der Ort des Durchtritts von Flüssigkeit und kleinmolekularen Substanzen durch die Zellschicht liegt noch nicht mit wünschenswerter Sicherheit fest. Der Durchtritt kann durch die Wirkung von Mediatoren unter Öffnung von interzellulären Spalten oder durch die direkte Schädigung der Endothelzellen erfolgen, was einen Verlust von Plasma zur Folge hat.

Es sind auch Wege durch das Zytoplasma, z.B. an besonders dünnen Stellen, durch Fensterung oder durch Pinocytose zu diskutieren.

6.3.

Mediatoren

HABERMANN stellt daher zwei Typen von gefäßaktiven Pharmaka gegenüber:

- Typ I - Mediatortyp - greift am labilen und dünnen Endothelschlauch (Tunica interna) an und reguliert die Feinfilterfunktion für Plasmaproteine.
- Typ II wirkt durch eine Schädigung der Basalmembran (Tunica media) und des fibrillären Halteapparates (Tunica externa).

6.3.1.

Typ I: Kinine und Prostaglandine

Die Erhöhung der Durchlässigkeit durch Substanzen vom Mediatortyp beschränkt sich auf den Austritt löslicher Stoffe sowie von Kolloiden (z.B. Tusche) und ist - soweit untersucht - mit Änderungen der Gefäßweite verbunden. Solche Änderungen sind an der Blutdrucksenkung bei systemischer Applikation erkennbar. Entsprechende Faktoren sind Kallidin und Bradykinin (131), Permeabilitäts-globuline sowie Histamin und Serotonin.

Ferner wird die zunehmende Permeabilität auf eine Beteiligung verschiedener Prostaglandintypen zurückgeführt, die in der menschlichen Haut gefunden wurden. Dabei sollen Prostaglandine von Typ E1 und E2 einen lokalen Permeabilitätseffekt für Histamin, Bradykinin und Serotonin aufweisen (24). Der vaskuläre Permeabilitätseffekt des Prostaglandin E wird durch die Degranulation von Mastzellen vermittelt (66).

Die Mediatoren steigern experimentell mehr die Permeabilität der Venolen als die der Kapillaren. Nach einer hämodynamischen Theorie kontrahieren sich die kleinsten Venen, zusätzlich dilatieren Arteriolen unter dem Einfluß der Mediatoren, wodurch der venoläre und kapilläre Druck steigen. Es kommt damit zur Permeabilitätssteigerung, Stase und Hämokonzentration.

Die Permeabilitätserhöhung mit dem Auseinanderrücken der Endothelzellen ist nach dieser Theorie ein Überdehnungsschaden, der die Venolen besonders stark betrifft, da sie muskelarm sind und im lockeren Bindegewebe liegen.

6.3.2.

Typ II: Proteasen und spezifische Faktoren

Die Permeabilitätserhöhung von Typ II beruht auf der Strukturgiftigkeit z.B. von Tensiden, Proteasen wie Trypsin und Chymotrypsin, Phospholipase A und im Gefolge davon Lysolecithin, Kollagenasen, Hydrolasen und anderen spezifischen Faktoren. Eine Schädigung von Typ II führt daher zum Zusammenbruch der Schranke überhaupt und im extremen Fall zur Hämorrhagie.

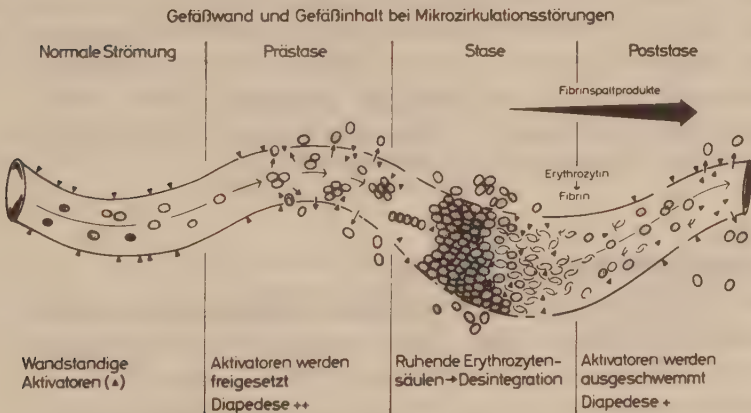


Abb. 16: Einfluß der Kinine und anderer spezifischer Faktoren auf die Gefäßpermeabilität
(aus: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie,
Band 4, Schattauer-Verlag, Stuttgart, 1969)

6.4.

Flüssigkeitsverlust und Hämokonzentration

Die Folge des thermischen Traumas ist ein enormer Verlust von proteinreicher Flüssigkeit, da nach COPE und MOORE (23) die Kapillaren in der verbrannten Haut fast so durchlässig für Kolloide werden wie normale Kapillaren für Ionen. Das Ödem nach Verbrennungen oder Verbürhungen ist also obligat und nicht zu verhindern. Quantitativ entspricht dieses Ödem bei Verbrennungen von 30% oder mehr der Körperoberfläche rund 10% des Körpergewichtes.

Der Flüssigkeitsverlust bei ausgedehnter Verbrennung setzt sich also zusammen aus dem Wundexsudat, das 3 bis 4% Protein enthält, dem ebenfalls eiweißhaltigen Ödem und dem Verlust an destilliertem Wasser durch Verdampfung auf der verbrannten Haut. Dieser Flüssigkeitsverlust führt zu einer Hämokonzentration - der Hämatokritwert nimmt nach UNDERHILL (140) zu - und damit zur Stase, die noch unterstützt wird durch reaktive Vasokonstriktion. Es kommt zu einer gefährdeten Organdurchblutung vor allem von Niere und Darmtrakt; aber auch die Leberschädigung ist ein integrierter Teil des Burn Syndroms (STENBERG und HOGEMANN, 127).

6.5.

Störung der Mikrozirkulation

Da es durch Verbrennung außerdem zu schweren Erythrocytendeformierungen kommt (14), wobei die Zellflexibilität verlorenggeht und die Passage durch engste Gefäße blockiert wird, ist die Störung der Mikrozirkulation das entscheidende Symptom bei schweren thermischen Läsionen.

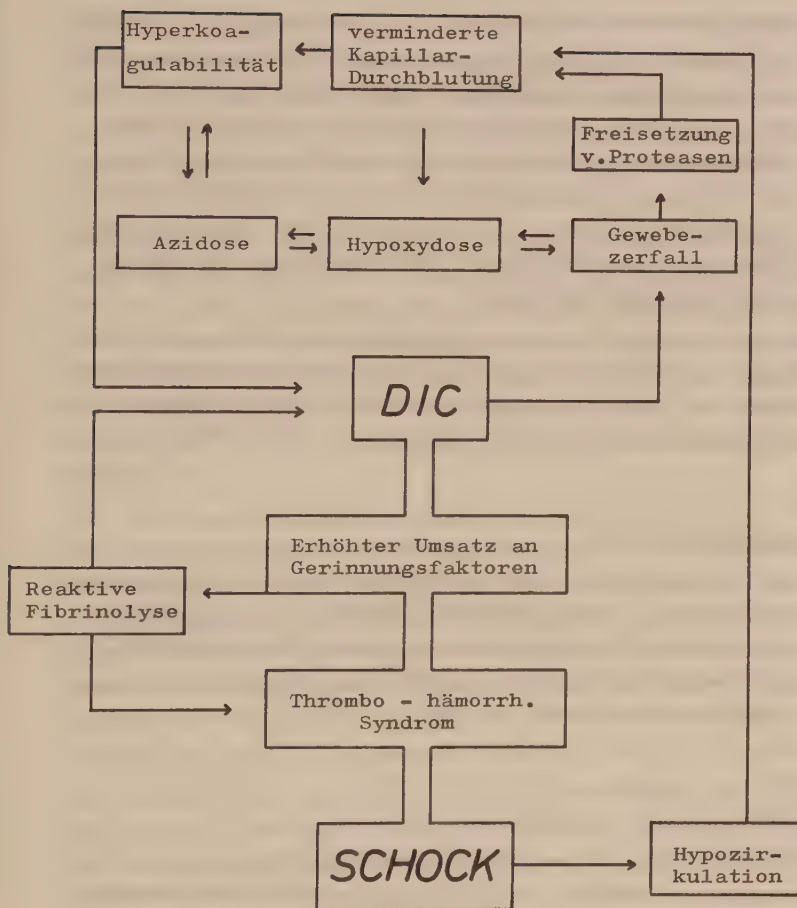


Abb. 17: Reaktive Fibrinolyse (aus: Neue Aspekte der Trasylo1-Therapie, Band 5, Schattauer-Verlag, Stuttgart, 1972)

6.6.

Circulus vitiosus des Schocks

Es beginnt hier ein Circulus vitiosus, der nicht nur für den massiven Überhitzungsschock charakteristisch ist, sondern auch das Kardinalsymptom aller übrigen bekannten Schockformen darstellt; wobei Schock definiert ist als ein Zustand beeinträchtigter Kreislaufverhältnisse mit ungenügender Gewebsperfusion und einem Mißverhältnis zwischen dem Sauerstoffbedarf der Gewebe und der am Ort vorhandenen Sauerstoffmenge.

Innerhalb der verschiedenen Schockformen nehmen der Verbrennungs- und der Verbrennungsschock eine Sonderstellung insofern ein, als bei diesen bereits in der Frühphase eine Übergerinnbarkeit im Vordergrund steht (76).

6.6.1.

Hyperkoagulabilität

In Abb. 17 (111) wird mit der frühzeitigen Hyperkoagulabilität und der verminderten Kapillardurchblutung der Eintritt in den oben erwähnten Circulus vitiosus deutlich: verminderte Kapillardurchblutung bewirkt Hypoxydose der zu versorgenden Gewebe.

6.6.2.

Azidose

Als metabolische Folge einer unzureichenden Sauerstoffversorgung der Gewebe - die Zellen wechseln vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel (59) - entwickelt sich eine Azidose, die in erster Linie durch den vermehrten Anfall von Milchsäure bedingt ist (26, 118, 156).

Die Laktatazidose stimuliert das Nebennierenrindenmark (101), wodurch Noradrenalin und Adrenalin vermehrt ausgeschüttet werden und Erhöhungen des Adrenalingehaltes im Blut um das 50fache und des Noradrenalingehaltes um das 8fache erreicht wurden (29, 81).

6.6.3.

Strömungsverlangsamung

Diese und andere sich in Geweben und Gefäßen stark anhäufenden, vasodilatatorisch wirkenden Metabolite führen zur Hyperosmose im Gewebe und zur maximalen Eröffnung des Kapillarkreislaufes und somit zur Strömungsverlangsamung (63).

Verstärkt wird dieser Prozeß dadurch, daß es zu einer Leukodiapedese kommt. Aus den Leukozyten werden Proteasen in Freiheit gesetzt; der bestehende niedrige pH verstärkt dabei die Proteasenfreisetzung, die den Abbau von größeren Eiweißmolekülen begünstigt und damit wieder zu einer Erhöhung der Hyperosmose beiträgt. Auf die Freisetzung der Proteasen wird an späterer Stelle noch eingegangen.

Die Strömungsverlangsamung bewirkt eine Separation (Skimming) von Plasma und corpuskulären Blutbestandteilen (21, 106, 121, 157) und, durch die längere Verweildauer gerinnungsaktiver Substanzen in der Endstrombahn, weil diese nur unzureichend zu den Clearanceorganen abtransportiert werden, indirekt eine Hyperkoagulabilität, charakterisiert durch den Abfall der Thrombozyten und durch eine Aktivierung der Faktoren 5 und 8.

Im Thrombelastogramm sieht man eine Verkürzung von r (Reaktionszeit), während trotz verminderter Thrombozytenzahl die maximale Amplitude des Thrombelastogramms zunächst breiter wird.

6.6.4.

Verbrauchskoagulopathie

Da die Hyperkoagulabilität auch, wie schon vorher beschrieben, direkt durch die Überhitzung des Gewebes in-

duziert wird, kann sie leicht überkritisch werden, und eine ursprünglich funktionelle reversible Störung der Mikrozirkulation kann jetzt in ein unkontrolliertes und unmäßiges Gerinnen des zirkulierenden Fibrinogens übergehen. Diese Mikrothrombosierung beginnt mit der Freisetzung einer gerinnungsaktiven Substanz wie Gewebsthromboplastin in die Zirkulation, was zur Bildung von Thrombin führt, welches wiederum das zirkulierende Fibrinogen in Fibringerinnseel überführt, abgekürzt DIC (= disseminated intravascular coagulation) genannt. Im deutschsprachigen Schrifttum wird sie auch als Verbrauchskoagulopathie bezeichnet.

Ausgehend von der Aktivierung des HAGEMAN-Faktors läuft die Mikrothrombosierung mit dem Verbrauch folgender Faktoren ab: I (Fibrinogen), II (Prothrombin), V (Proaccelerin), VIII (Antihämphiles Globulin), XIII (fibrin - stabilisierender Faktor).

Charakteristisch bei der DIC und in vielen Arbeiten beschrieben (8, 56, 71, 80, 88, 104, 110, 125) ist die Aufeinanderfolge von Hyper- und Hypokoagulabilität mit ausgedehnten intravasalen Gerinnungsvorgängen.

Tritt dabei eine kritische Verminderung des Hämostasepotentials auf, hat dies eine haemorrhagische Diathese zur Folge (78, 80, 102), charakterisiert durch die Thrombozytopenie mit Zahlen von oft weniger als 50.000 pro mm³.

Gleichzeitig neben quantitativen Plättchenverlusten treten auch grobe qualitative Störungen der noch in der Zirkulation verbleibenden Thrombozyten auf. Sie gleichen den sogenannten Serumthrombozyten.

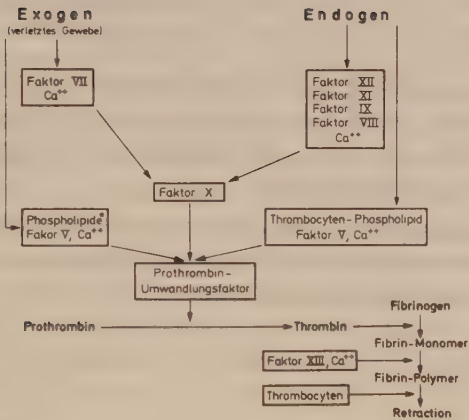


Abb. 18: Schematische Darstellung der Blutgerinnung
(aus: Medizinische Physiologie, Springer-
Verlag, Berlin, 1971)

6.6.5.

Hyperfibrinolyse

Pathologisch anatomisches Substrat der intravaskulären Gerinnung sind Fibrindepositionen in der Gefäßperipherie, seit 1900 Shock-bodies genannt, und letztlich von SANDRITTER (119) nachgewiesen. Bei dieser intravasalen Gerinnung entwickelt sich nicht nur ein gesteigerter Umsatz an Gerinnungsfaktoren, sondern die haemorrhagische Diathese wird häufig noch durch eine reaktive Hyperfibrinolyse bzw. allgemeine Proteolyse verstärkt.

Das klinische Bild der Blutungsbereitschaft - thrombohaemorrhagisches Syndrom genannt - entsteht auf zwei Wegen: 1. durch einen gesteigerten Faktorenumsatz und

2. durch eine verstärkte Proteolyse.

Diese Thromben werden in der Mikrozirkulation aller Organe abgefangen, so daß im Extremfall das zirkulierende Plasma dem Serum gleicht, wie wenn eine Blutgerinnung *in vitro* stattgefunden hätte.

Durch die Gegenwart von Thrombin in der Mikrozirkulation werden aus dem Gefäßendothel, dem die Gerinnsel anhaften, Plasmin-Aktivatoren freigesetzt.

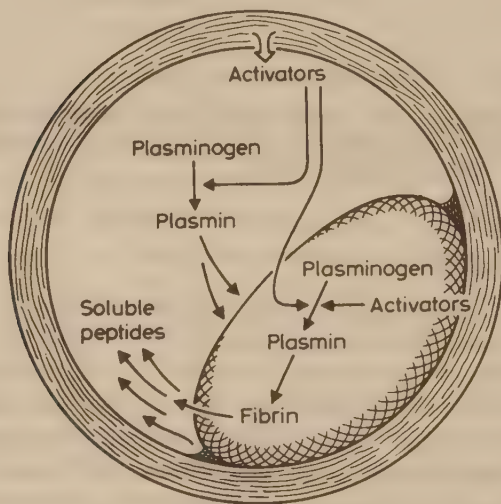


Abb. 19: Aktivierung des fibrinolytischen Systems
(aus: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie,
Band 3, Schattauer-Verlag, Stuttgart, 1969)

Das Plasminogen, welches in dem Gerinnsel enthalten ist oder im Serum dem Gerinnsel anliegt, wird in das proteolytische Enzym Plasmin überführt, welches die Thromben enzymatisch zu löslichen Fibrin-Spaltprodukten abbaut. Eine Anzahl von Abbauprodukten wurde identifiziert und charakterisiert; einige haben stark gerinnungshemmende Wirkung. Wenn das Verhältnis Abbauprodukte zu Fibrin hoch ist, wird das letztere hierdurch gehindert, sich zu Gerinnseln zu polymerisieren, statt dessen zirkuliert es in Form von löslichen Komplexen mit Fibrinogen oder den Abbauprodukten (89). Der Dualismus zwischen pathologischer Gerinnung des zirkulierenden Blutes und reaktiver lokaler Hyperfibrinolyse bildet die biochemische Grundlage der Mikrothrombosierung. Die Ursachen der Umsatzsteigerung sind meist vielschichtig; als wesentlich gelten jedoch:

- 1) Schockzustände, verbunden mit Störung der Mikrozirkulation sowie lokaler Hypoxie und Azidose (17, 52, 53, 102);
- 2) Freisetzung von gerinnungsaktiven Substanzen aus Organen (z.B. Lunge oder Prostata) und Einschwemmung in die Blutbahn (56, 102);
- 3) Blockierung oder unzureichende Durchströmung des retikulo-endothelialen Systems (RES) und damit ungenügende Abräumung von gerinnungsaktiven Substanzen aus der Blutbahn (78, 102).

6.6.6.

Proteolyse

Nicht nur Blutgerinnungs- und Fibrinolyse-System sind durch Mediatoren in ihrer Reaktion koordiniert, sondern beide stehen auch in einem Wechselverhältnis zum bekannten Kininsystem, wie Abb. 20 veranschaulicht.

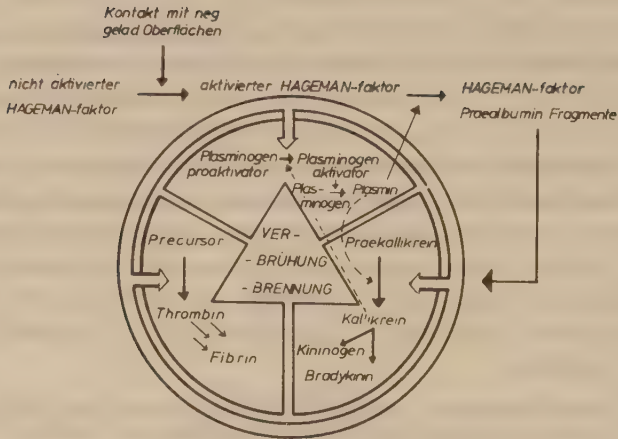


Abb. 20: Zusammenhang zwischen dem Fibrinolyse-, Blutgerinnungs- und Kininsystem (aus: Neue Aspekte der Trasylo1-Therapie, Band 3, Schattauer-Verlag, Stuttgart, 1969)

Der bei der Blutgerinnung durch den Kontakt mit benetzbaren Oberflächen und dem Plasmaverdünnungseffekt aktivierte HAGEMAN-Faktor führt u.a. zur Freisetzung dreier aktiver Proteasen: Thrombin, Plasmin und Kallikrein. Diese Vorgänge werden u.a. durch die in der Triade aufgezeigten Traumen in Gang gesetzt. Von allen drei Proteasen weiß man, daß sie direkt oder indirekt Kinin bilden (28, 51; siehe auch Abb. 2, S. 8).

Ferner werden sowohl aus den durch die massive Verbrennung lokal zerstörten Zellen sowie aus den durch die vorher erwähnte Azidose zerstörten Zellen und Lysosomen

(41, 64) leukozytäre Proteinasen, Plasmin und Kininogenasen freigesetzt (44). Diese Proteinasen haben wiederum eine schädigende Einwirkung auf die Mikrozirkulation (60) entweder durch direkte Einwirkung oder durch die Freisetzung von vasoaktiven Kininen aus Kininogen (31). Ferner setzen sie die Gerinnungszeit des Blutes herab. Im Pankreas kommt es zur Freisetzung eines Humoralfaktors, der die Myocardfunktion schädigt (MDF = myocardial-depressant-factor)(81), ferner zur Ausschüttung eines lungenschädigenden Faktors (32), dessen Ursprung unbekannt ist.

Aktiviert proteolytische Enzyme geraten auch in den Kreislauf und können dort Plasmaeiweißkolloide und Proteohormone abbauen. Das im Kreislauf vorhandene fibrinolytische Potential kann aktiviert werden, und es kommt zu einem Abbau von Fibrinogen, Albumin und einigen Gerinnungssubstanzen und -enzymen (Faktor 5 und 7). Ein Einsetzen der Proteolyse konnte bereits in den ersten Minuten nach einer Verbrennung nachgewiesen werden.

Dies würde auch den von GREUER gefundenen Blutzuckeranstieg nach Verbrühungen erklären, der durch den Abbau des Proteohormons Insulin durch Serumprotryptase verursacht sein könnte (42, 43).

Labortechnisch konnte erstmals ROCHA e SILVA nachweisen, daß beim Verbrühen oder Erhitzen von Hautpartien mit 45°C in der Durchströmungsflüssigkeit Histamin, Serotonin und eine kininartige Substanz frei werden (115).

Die Wirkungen der Kinine beruhen u.a. auf Gefäßerweiterung und Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Wirkungen also, die den Verlauf des Schocks zusätzlich negativ beeinflussen.

ZWEIFACH (157) zeigte nach lokaler Gabe von Kininen eine Erweiterung sowohl der arteriellen wie venösen Seite der Endstrombahn und eine Zunahme der Zahl der durchströmten Kapillaren.

Inzwischen folgten weitere Arbeiten von LEWIS, SPECTOR und WILLOUGHBY sowie ARTURSSON, die das Auftreten von Kininogenasen und Kininen in der das überhitzte Gewebe drainierenden Lymphe herausstellten, wobei LEWIS dies auf eine vorausgehende Freisetzung von Histamin zurückführte (3, 122).

Bei hoher proteolytischer Enzymaktivität, die bei Verbrennungen entsteht, ergibt sich die Möglichkeit, daß die im Plasma vorhandenen Inhibitoren proteolytischer Enzyme α_1 -Antitrypsin, Inter- α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin verbraucht bzw. überspielt werden. Es kommt dann zu massiven Schädigungen des Organismus: Fibrinolyseblutungen infolge Fibrinogenmangels, proteolytischem Abbau der Plasmaeiweißkolloide und in schweren Fällen zum letalen Ausgang.

Diese für den lebenden Organismus gefährlichen Reaktionsabläufe können mit intravenös zugeführten Inhibitoren zum Teil beeinflußt werden.

7.

Pathophysiologische Bedeutung der proteolytischen Enzyme und des Trasylol im Verbrühungsschock

7.1.

Proteolytische Enzyme

Wie im vorigen Kapitel erwähnt, wirken proteolytische Vorgänge polyvalent auf das krankmachende Geschehen nach Verbrennungen. Abb. 21 zeigt das Aktivierungsschema der proteolytischen Enzyme, im besonderen das der Profibrinolysekinase im Blutkreislauf.

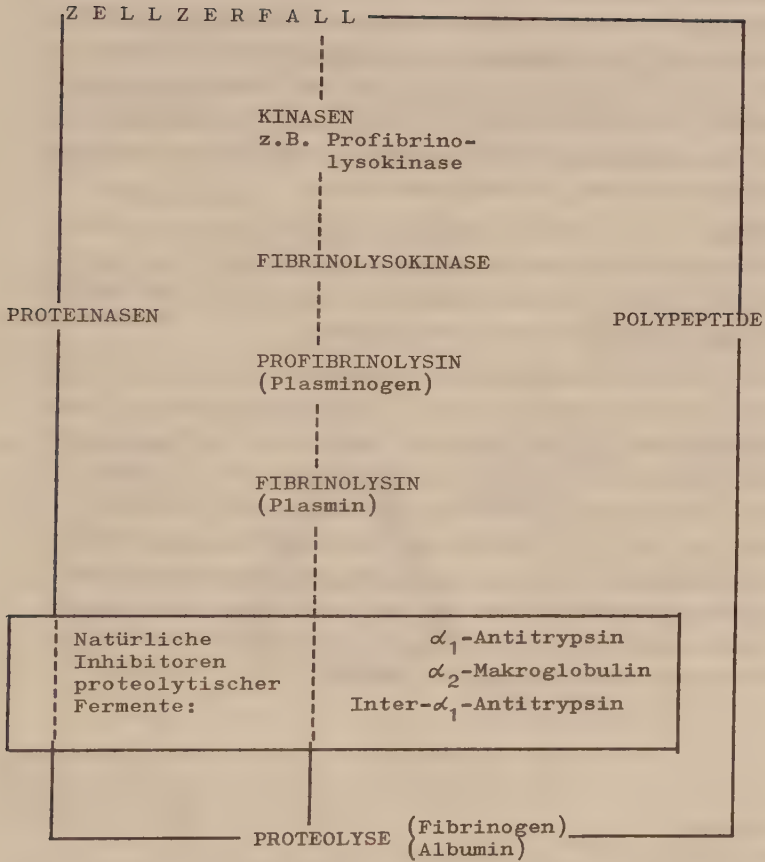


Abb. 21: Aktivierungsschema des Fibrinolysin

Die im Zellverfallsvorgang freigesetzte oder durch den HAGEMAN-Faktor aktivierte Profibrinolysokinase bewirkt über die Fibrinolysokinase eine Aktivierung von Profibrinolysin (Plasminogen) zum Fibrinolysin (Plasmin). - Daß Plasmin auch autokatalytisch aus Plasminogen entstehen kann, zeigt Abb. 22, in der das Zusammenspiel der verschiedenen Systeme (Kinin-, Gerinnungs- und Fibrinolysesystem) verdeutlicht wird.

GREUER et al. (44) wiesen nach, daß die freigesetzten Proteinasen die zelleigenständigen Vorstufen proteolytischer Enzyme in der Leberzelle aktivieren und ihre Abgabe ins Blut veranlassen können.

Auch beim gesunden Menschen finden ständig physiologische Zelluntergänge statt. Die Wirksamkeit der hierbei entstehenden proteolytischen Enzyme wird jedoch durch die bereits erwähnten, im Blut befindlichen natürlichen Proteinaseinhibitoren neutralisiert. Kommt es aber wie bei der Verbrennung zu einem vermehrten Zelluntergang und damit zu einem überschießenden Angebot proteolytischer Enzyme, so ist es möglich, daß die im Plasma vorhandenen Inhibitoren proteolytischer Enzyme verbraucht bzw. überspielt werden.

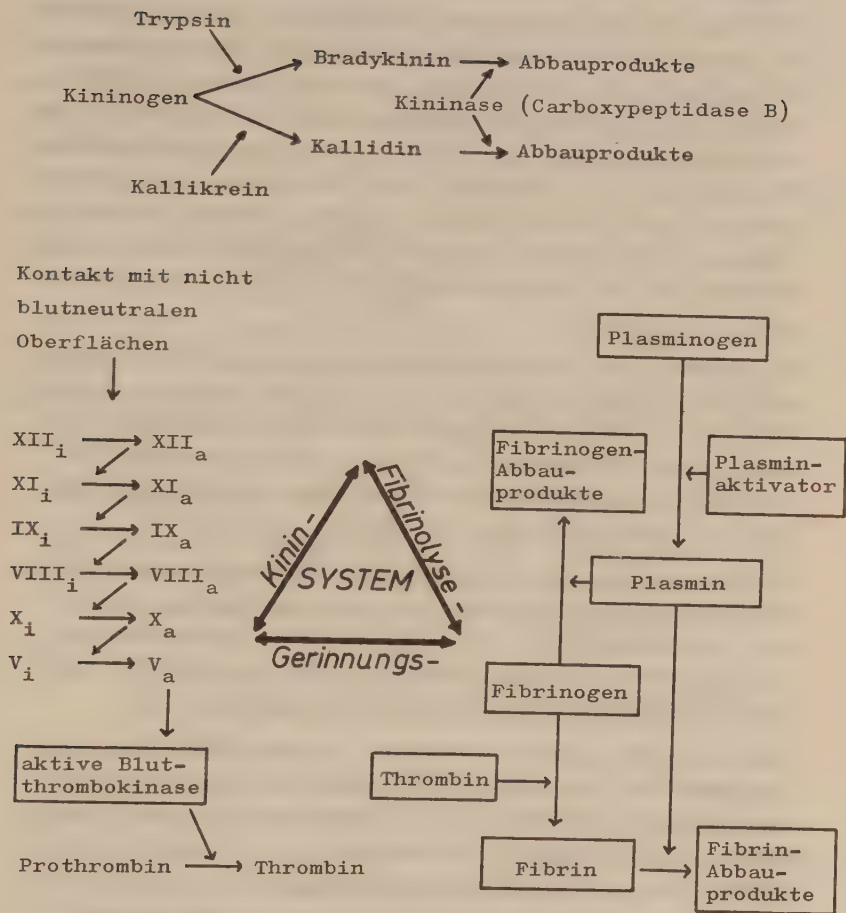


Abb. 22: Zusammenspiel von Kinin-, Gerinnungs- und Fibrinolysesystem

7.1.1.

Inhibition proteolytischer Enzyme durch Trasylol

In diese für den Organismus gefährlichen Reaktionsabläufe kann mit einer Substitutionstherapie eingegriffen werden und zwar mit Inhibitoren, die intravenös zugeführt werden. Der hierbei eingesetzte und bisher am besten untersuchte Proteinaseinhibitor Trasylol hat ein breites Wirkungsspektrum. Trasylol hemmt Proteinasen mit proteolytischer und esterolytischer Wirkung. Hierzu gehören Kalikrein, Chymotrypsin, Plasmin, Plasminaktivator, Plasmafaktoren in der Gerinnungsvorphase, Gewebs- und leukozytäre Proteinasen.

Die Hemmung der proteolytischen, esterolytischen und kininliberierenden Aktivität dieser Enzyme erfolgt in der Form, daß sich der Hemmbezirk des Inhibitormoleküls an das aktive Zentrum des jeweiligen Enzyms anlagert. Es bildet sich ein reversibler, inaktiver Enzym-Inhibitor-Komplex im Molverhältnis 1:1 (WERLE, 1969; 151).

Der Hauptanteil des Gerinnungshemmeffektes besteht in der Hemmung der Entstehung der aktiven Blutthrombokinase aus Plasma- und Serumfaktoren, Kalium und Thrombozytenfaktor 3. Trasylol hemmt den aktiven Faktor 9 und unvollkommen die aktiven Faktoren 5 und 10.

Bei der Verbrauchskoagulopathie ist nach HERSCHLEIN und STEICHELE (56) Trasylol im Vergleich zu synthetischen Inhibitoren wie EAC, AMCH und PAMBA der geeignete Inhibitor. Dies bestätigt auch RITTER (114), indem er sagt, daß die antithromboplastische Wirkung des Trasylol, wenn auch in 3 - 5facher Dosis, verglichen mit der antifibrinolytisch wirksamen Menge zunächst den Nachstrom thromboplastischen Materials bremst. Die anschließende Inhibition der überschießenden aktivierten Fibrinolyse stellt aber keine Gefahr mehr dar. Weiterhin empfehlen RITTER sowie HÜNEMEYER (114) zur Therapie der DIC die Kombination von Trasylol mit Heparin.

7.2.

Das Verbrührungsschockmodell

Um die komplexen Wirkungen des neuen Inhibitors aus Weinbergschnecken (*Helix pomatia*) bzw. aus Mikroorganismen zu testen und mit der therapeutischen Wirksamkeit des Trasylol (und anderer Pharmaka) vergleichen zu können, wählten wir aus den verschiedenen Schockmodellen, wie z.B.

- sept. Schock,
- Entblutungsschock,
- Dextranschock,
- Endotoxinschock,
- Peritonitisschock,

das Verbrührungsschockmodell aus, da es folgende Vorteile bietet:

- 1) Relativ geringer labortechnischer, operativer Aufwand;
- 2) Exakte Reproduzierbarkeit der Verbrührung;
- 3) Große Versuchsserien in relativ kurzer Zeit;
- 4) Statistische Auswertbarkeit und Verifizierbarkeit bei genügend großen Versuchsserien;
- 5) Überlebensrate (in %) und Überlebenszeit sind exakt zu bestimmen und trotz ihrer Einfachheit die wichtigsten therapeutisch deutbaren Kriterien.

Außerdem lassen sich die Versuchsergebnisse weitgehend auch auf andere Schockformen übertragen, da sich bei allen Schockformen nach einer gewissen Anlaufzeit die gleichen Grundmechanismen abspielen (HABERLAND: Prinzip der gleichen Endstrecke).

Des weiteren brachten Therapieversuche mit Inhibitoren bei anderen Schockmodellen sehr stark voneinander abweichende Ergebnisse und waren damit quantitativ schlecht auswertbar. Das Überhitzungsmodell erwies sich diesbezüglich als wesentlich günstiger.

Zur Erzielung eines Verbrennungstraumas sind in der Literatur verschiedene Modelle beschrieben:

- Verbrennung mit einem Brandeisen (BROOKS und Mitarbeiter, 18);
- Verbrennung mittels Lichtbogen (PEARS und KINGSLEY, 108);
- Verbrennung mittels Bunsenbrennerflamme (GRISOLA und Mitarbeiter, 45);
- Verbrühung mit heißem Wasser (Mc.CARTHY, 1945, ARTURSSON, 1964, SCHILDT und NILSSON, 124).

Die Verbrühung ist die am häufigsten gewählte Methode, um einen experimentellen Verbrennungsschock zu erzeugen, da hierbei die Verbrennungsfläche (Eintauchtiefe) und der Verbrennungsgrad (Verbrennungszeit, Temperatur) gut kontrollierbar sind. Außerdem ist es die einfachste Art und Weise, die partielle Verbrennung - eben durch Eintauchen in heißes Wasser - bei einer Ratte zu erzielen.

Wie bei den Ausführungen über die Verbrennungskrankheit beschrieben, werden dabei im menschlichen Körper 3 Systeme aktiviert:

1. das Kininsystem,
2. das Gerinnungssystem,
3. das Fibrinolyse-system.

Außerdem werden Gewebsproteasen freigesetzt. Die neuen Inhibitoren, die wir getestet haben, sind in ihrer Wirkung polyvalent, d.h. sie wirken auf alle drei aufgeführten Systeme.

Um einen Verbrennungsschock zu erzielen, muß man ausgedehnte Hautflächen verbrühen. Da wir der Literatur entnehmen konnten, daß es beim Eintauchen der Tiere in heißes Wasser bis zur Hüfte oder zur Axilla zu unerwünschten Schädigungen an Schwanz, Pfoten sowie an der urethralen und analen Öffnung kommt, wählten wir die von McCARTHY

1945 entwickelte Methode der "back-burn-procedure", also des Eintauchens des Rückens der Tiere. Mit dieser Methode konnte die fragwürdige Hitzeeinwirkung auf den Bauch und damit auf die Därme der Tiere, was die Freisetzung von Endotoxinen aus den Darmbakterien zur Folge hat, vermieden werden. Diese Endotoxine können die hitzegeschädigte Darmwand durchdringen und bringen damit einen nicht kontrollierbaren unerwünschten Faktor mit ins Spiel.

Außerdem bleiben bei der von uns gewählten Methode die Extremitäten funktionsfähig, und das Tier behält somit seine Bewegungsfreiheit. Auch sind die Funktionen der Ausscheidungsorgane nicht beeinträchtigt, was besonders wesentlich ist. Ferner können die Tiere auch nicht das verbrühte Gewebe selbst anfressen, was zusätzliche Traumen verhindert.

Als sehr wichtig ist abschließend zu vermerken, daß die Injektionsmöglichkeit (i.p. oder i.v.) erhalten bleibt.

D

EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

8.

Versuchstiere

Als Tiermaterial dienten ca. 600 Albinoratten. Es handelte sich bei ihnen ausschließlich um jungfräuliche weibliche Tiere vom SPRAGUE-DAWLEY-Stamm. Sie stammten von der Versuchstierzüchtungsanstalt BÄUMLER in Wolfratshausen bei München.

8.1.

Haltung und Fütterung der Tiere

Die Ratten wurden jeweils 1 Woche vor dem Versuchstag geliefert und bis zur Schocksetzung in Sammelkäfigen in Gruppen von ca. 20 Stück im Tierstall gehalten. Sie erhielten Altromin-Standard-Futter (Altrogge-Kraftfutter GmbH, Lage/Lippe). Bis 24 Std. vor Versuchsbeginn standen Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Die Raumtemperatur betrug durchschnittlich 27°C (Schwankungen zwischen 25°C und 29°C), da HORST, MENDEL und BENEDICT festgestellt hatten, daß bei dieser Temperatur die geringste Stoffwechselrate bzw. ein Zustand des Temperaturgleichgewichts vorherrscht.

Nach der Verbrühung wurden die Tiere in durchsichtigen Makrolon-Einzel-Käfigen gehalten, um Kannibalismus zu vermeiden und ein genaues Kontrollieren zu ermöglichen.

8.2.

Vorbereitung der Tiere für den Versuch

1 Std. vor Beginn des Experiments wurde die benötigte Anzahl von Tieren mit einem Gewicht von 200 ± 5 g aussortiert.

Etwa 45 Min. vor dem Versuch wurden die noch ungescho-
renen Tiere mit 2 ml 3,6%igem Chloralhydrat verdünnt
mit 5 ml Ringer-Lösung pro Ratte narkotisiert. Chlor-
alhydrat wurde als Anästhetikum gewählt, da bei der
Äthernarkose, wie sie McCARTHY und MILES benutzten,
eine genaue Kontrolle der Applikationsmenge nicht mög-
lich ist. Diese Lösung wurde intra-peritoneal mit ste-
rilen Spritzen und Kanülen injiziert.

In narkotisiertem Zustand wurden den Tieren anschlie-
ßend der Rücken und bis auf einen schmalen Streifen
auch der Bauch mit einer elektrischen Friseur-Scher-
maschine kahl rasiert. Anschließend wurden sie mit dem
Enthaarungsmittel Pilca enthaart. Um eine Unterkühlung
der nackten Tiere zu verhindern, wurden sie in einem
Plastikbehälter mittels eines Heizstrahlers warmgehal-
ten.

In umfangreichen Vorversuchen hatten wir festgestellt,
daß ein zusätzliches Enthaaren nach dem Scheren für
ein exaktes Ergebnis unerläßlich ist; denn in dem nach
der Schur noch verbleibenden Haarpolster setzen sich
Luftblasen fest, die dort, wo sie auftreten, als eine
Art Isolierschicht wirken. Da wir beabsichtigten, eine
über die gesamte Verbrühungsfläche gleichmäßige Tempe-
ratureinwirkung zu erzielen, benutzten wir das Ent-
haarungsmittel Pilca, wodurch gleichmäßiger Wasserkon-
takt gewährleistet war. Aber erst durch Zusatz eines
Detergentiums in das Laborwasserbad erreichten wir die
von uns erwünschte Konstanz der Temperatureinwirkung
auf die Verbrühungsfläche.

9.

Versuchsbeschreibung

Da die Verbrühungsmethode von MILES und McCARTHY keine genau kontrollierbare Eintauchtiefe und kein konstantes Verbrennungsfeld gewährleistet und außerdem noch mit negativen Nebenwirkungen, wie im Abschnitt 7.2. beschrieben, belastet ist, gingen wir folgendermaßen vor:

Die an Vorder- und Hinterbeinen mittels Leukoplast gefesselte Ratte wurde auf eine gebogene Kramerschiene gespannt, der Kopf ebenfalls mit Leukoplast unverrückbar auf der Schiene justiert und der Schwanz zwischen den Hinterfüßen hindurchgezogen. Der Abstand zwischen den zwei bestimmten Sprossen der Kramerschiene, an die die Vorder- und Hinterfüße gefesselt waren, wurde vor jedem Versuch gemessen, um so eine weitgehend gleichmäßige Spannung der Rückenhaut zu gewährleisten. Zur Kontrolle der Eintauchtiefe benutzten wir anatomische Merkmale (schmaler Streifen des stehengelassenen Fells an der Bauchseite u.a.m.) sowie die Tatsache, daß sich die Kramerschiene gerade noch über der Wasseroberfläche zu befinden hatte. So gelang es uns, ein konstantes Verbrennungsfeld von ca. 38% der Körperoberfläche zu erreichen. Das Verhältnis verbrühter zu unverbrühter Körperoberfläche wurde in % der Gesamtoberfläche bestimmt, die nach der Formel von LEE berechnet wurde:

$$A = K \times W^{2/3}.$$

(A = Oberfläche in cm^2 ,
W = Körpergewicht in Gramm,
K = 10)

Die Verbrühungsfläche wurde bestimmt, indem der Umfang des verbrannten Areals auf ein Stück entwickelten Röntgenfilms aufgetragen und ausgeschnitten wurde. Mit der Analysenwaage wurde im Verhältnis zu einer bekanntgroßen Vergleichsfläche die cm^2 -Zahl bestimmt.

Die Verbrühung des Rückens der Ratte selbst wurde bei konstanter Temperatur von $93^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ in einem Laborwasserbad vorgenommen. Der schon erwähnte Zusatz von Detergentien sicherte die angestrebte gleichmäßige Benetzung; die Wassertemperatur wurde mittels Thermostat und Umwälzanlage (= elektrisch betriebener Quirl) konstant gehalten.

Die Verbrühungszeit wurde mit einer Stoppuhr kontrolliert und betrug bei 93°C Wassertemperatur exakt 30 Sekunden. Wir wählten diesen hohen Temperaturwert, da schon eine geringe Herabsetzung der Wassertemperatur um 2°C zu erheblich längeren Überlebenszeiten und bei weiterer Verminderung zum Überleben beinahe sämtlicher Tiere führte.

In Vorversuchen hatten wir ermittelt, daß die Tiere unter diesen Bedingungen nach 14 Stdn. zu 100% gestorben sind und die mittlere Überlebenszeit 6 Stdn. und 30 Min. betrug.

Beim Anfertigen der Überlebenszeit-Kurven, die wir für die Auswertung der Statistik benötigten, fiel auf, daß die kritische Phase innerhalb der ersten 24 Stdn. nach der Verbrühung lag, d.h. die Tiere starben entweder in dieser Zeit oder überlebten danach mit wenigen Ausnahmen.

HABERLAND (48) beschrieb, daß bei Schockversuchen mit Ratten eine meteorologische Abhängigkeit dieser Tiere zum Ausdruck kommt. Auch wir konnten im Laufe unserer Versuche feststellen, daß die Versuchstiere zeit- und wetterabhängig verschieden reagierten und diese Unterschiede zu wesentlichen Auswirkungen auf die Versuchsergebnisse führten.

So beobachteten wir an einem Versuchstag im November, an dem für die Jahreszeit viel zu hohe Temperaturen, Tiefdruck und Regen herrschten, daß ein sehr hoher Prozentsatz der Tiere weit vor der Zeit starb. Um auch diese äußeren Faktoren möglichst konstant zu halten, legten wir unsere Versuche nun auf Tage mit ähnlicher und stabiler Wetterlage.

Auch die Tatsache, daß wir ausschließlich jungfräuliche weibliche Ratten verwandten, entsprach unserem Bestreben, die Versuche möglichst weit zu standardisieren, da wir aus der Literatur von BACK et al. (6) wußten, daß weibliche Tiere in ihrem Hormonhaushalt, was die Verbrennungskrankheit betrifft, wesentlich konstantere Werte aufweisen als männliche. Außerdem wies diese Arbeitsgruppe auch auf die große Bedeutung der Gewichtskonstanz bei den einzelnen Versuchstieren hin.

Unser Bemühen, die Versuche unter möglichst gleichen Bedingungen stattfinden zu lassen, ging so weit, daß bei den einzelnen Schritten des Versuchsablaufs (z.B. anästhesieren, rasieren, verbrühen usw.) jeweils die gleiche Person die gleiche Tätigkeit ausübte.

10.

1. Hitzeschockversuch

10.1.

Trasylo1 - Helicin

In diesem Versuch wurde erstmals der neuentdeckte Proteinaseinhibitor Helicin parallel mit dem seit langem erprobten Trasylo1 experimentell eingesetzt.

Trasylo1 wird seit 1953 erfolgreich in der Klinik zur Therapie und Prophylaxe von Schockzuständen und zur Prophylaxe postoperativer Komplikationen verwendet. Seine Hemmwirkung kommt über eine reversible Bindung an Proteinase zustande. Nachgewiesen ist ein Hemmeffekt auf Kallikreine, Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Plasminogen-Aktivierung, die Aktivierung von Plasmafaktoren in der Vorphase der Gerinnung sowie auf eine Reihe von Gewebs- und leukozytären Proteinase.

Der Inhibitor Helicin hemmt ebenfalls die Proteinase Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Organkallikrein.

Die Unterschiede zwischen beiden Inhibitoren liegen, wie auf S. 22 beschrieben, in:

1. der Vorinkubationszeit,
2. dem Hemmspektrum,
3. der Stabilität,
4. der Bindungszeit in der Niere.

In der Klinik wird Trasylo1 wie folgt dosiert: 500.000 KIE als Initialdosis und 200.000 KIE als Erhaltungsdosis (etwa alle 4 bis 6 Stdn.). Das entspricht einer Dosis von ca. 7.000 KIE/kg bzw. ca. 3.000 KIE/kg bei einem 70 kg schweren Patienten.

Die Letaldosis von Trasylo1 für Ratten liegt laut Firma BAYER bei 2,5 Mio. KIE/kg.

In den Voruntersuchungen, die diesen Experimenten vorausgingen, stellten wir fest, daß die günstigsten Überlebensraten für Ratten bei Dosierungen nicht unter 100.000 KIE/kg bzw. nicht über 200.000 KIE/kg erreicht wurden, also einem Vielfachen der klinisch angewandten Dosis. Aus diesem Grunde wählten wir eine entsprechend hohe Dosierung. Eine höhere Konzentration (z.B. 250.000 KIE) und/oder Erhaltungsdosen zu applizieren, war in diesem Versuch nicht möglich, da uns das Helicin nur in genau begrenzten Mengen zur Verfügung stand und in adäquaten Mengen zum Trasylol eingesetzt werden sollte.

Ziel dieses Versuches war es, anhand der Überlebensrate und -zeit festzustellen, ob Helicin in vivo eine ähnliche Hemmwirkung auf das Schockgeschehen ausüben kann wie Trasylol.

10.1.1.

Durchführung des Versuches

Es wurden insgesamt 40 Tiere verwendet. Ihr Gewicht lag bei 200 ± 5 g. Die Helicingruppe umfaßte 21, die Trasylolgruppe 19 Tiere. Die Verbrühungszeit betrug 30 Sek. bei 93°C . Sowohl Trasylol als auch Helicin wurden intraperitoneal injiziert. - Die intravenöse Applikationsart in die Schwanzvene wurde von uns ebenfalls erprobt; sie ist jedoch bei der Ratte äußerst schwierig durchzuführen und beeinträchtigte den zeitlichen Versuchsablauf erheblich. Daher wurde diese Methode von uns nur in Ausnahmefällen angewandt.

Die Applikationsmenge lag bei 100.000 KIE/kg Trasylol und entsprechend 100.000 IE/kg Helicin auf der Basis, daß 1,8 KIE einer mU-Trypsin-Inhibitoreinheit entspricht. Die Injektion erfolgte kurz vor Setzen des Schocks. Die Wahl des Injektionszeitpunktes geschah aus folgender Überlegung: Da es sofort nach der Verbrühung zu einer

überschießenden Freisetzung von Proteinasen aus geschädigten Lysosomen kommt, ist es angezeigt, daß sich der Inhibitor schon zu diesem Zeitpunkt in dem geschädigten Organismus befindet. Nur so wird eine gleichmäßige Verteilung des Inhibitors im Organismus gewährleistet. Daher applizierten wir die jeweiligen Inhibitorkonzentrationen 10 Min. vor der Verbrühung.

Zur Gabe des Inhibitors *n a c h* der Verbrühung konnten wir uns aus folgenden Gründen nicht entschließen: Da es sich bei dieser Arbeit um einen Screening-Test handelt, waren ganz konstante Versuchsbedingungen erforderlich. Diese Forderung nach absolut gleichen Bedingungen bei den ganzen Serien wäre bei einer *i.p.*-Gabe *n a c h* der Verbrühung nicht zu erfüllen gewesen, da 1. hierbei die Verteilung nicht gewährleistet ist und es 2. in den Vorversuchen bei fast allen Tieren zu Schock-Kreislauf-Dysregulationen kam, die sich so auswirkten, daß ein großer Teil der Tiere entweder kurz nach der Verbrühung starb oder mit einem speziell hierzu entwickelten Gerät beatmet werden mußte. Das hätte bedeutet, daß zumindest ein Teil der unter diesen Bedingungen überlebenden Ratten nicht aufgrund der Inhibitorwirkung, sondern wegen der oben beschriebenen Manipulationen in Kurven und Statistik eingegangen wäre, was eine Verzerrung oder Verfälschung des Versuchsergebnisses bedeutet hätte.

10.1.2.

Ergebnisse

60 Stdn. nach Schocksetzung lebten noch 12 Tiere der Helicingruppe und 5 der Trasylolgruppe. Prozentual gegenüber der Vergleichsgruppe = 100% bedeutet dieses Ergebnis eine Senkung der Mortalitätsrate bei Trasylol auf 74% und bei Helicin auf 43%.

Der Kurvenverlauf und die Diagramme (S.72+73) zeigen, daß in den ersten 4 Std. nach dem Trauma kein Tier der Helicingruppe, eines der Trasylolgruppe und bereits 7 der Vergleichsgruppe gestorben waren. Von der 4. bis zur 8. Std. starben 1 Tier der Helicin-, 2 der Trasylol- und abermals 7 der Vergleichsgruppe. Im Zeitraum zwischen der 8. und 12. Std. zeigte die Trasylolgruppe die höchste Mortalitätsrate = 5 Tiere, während es in der Vergleichsgruppe 3 und in der Helicingruppe wiederum nur 1 Tier waren. Von der 12. bis zur 16. Std. starben jeweils 3 Ratten der Trasylol- und Vergleichsgruppe und 1 Tier der Helicinserie. Zwischen der 16. und 24. Std. stellten wir 4 Verstorbene der Helicin- und 2 der Trasylolreihe fest, während zu diesem Zeitpunkt bereits alle Tiere der Vergleichsgruppe gestorben waren (zwischen 14. und 15. Std.).

10.1.3.

Statistik

Dieser und die folgenden Versuche wurden statistisch nach dem modifizierten WILCOXON-MANN-WHITNEY-Test (HALPERIN) ausgewertet. In diese Statistik gehen zwei Variable ein: Der unterschiedliche Kurvenverlauf und die totale Überlebensrate.

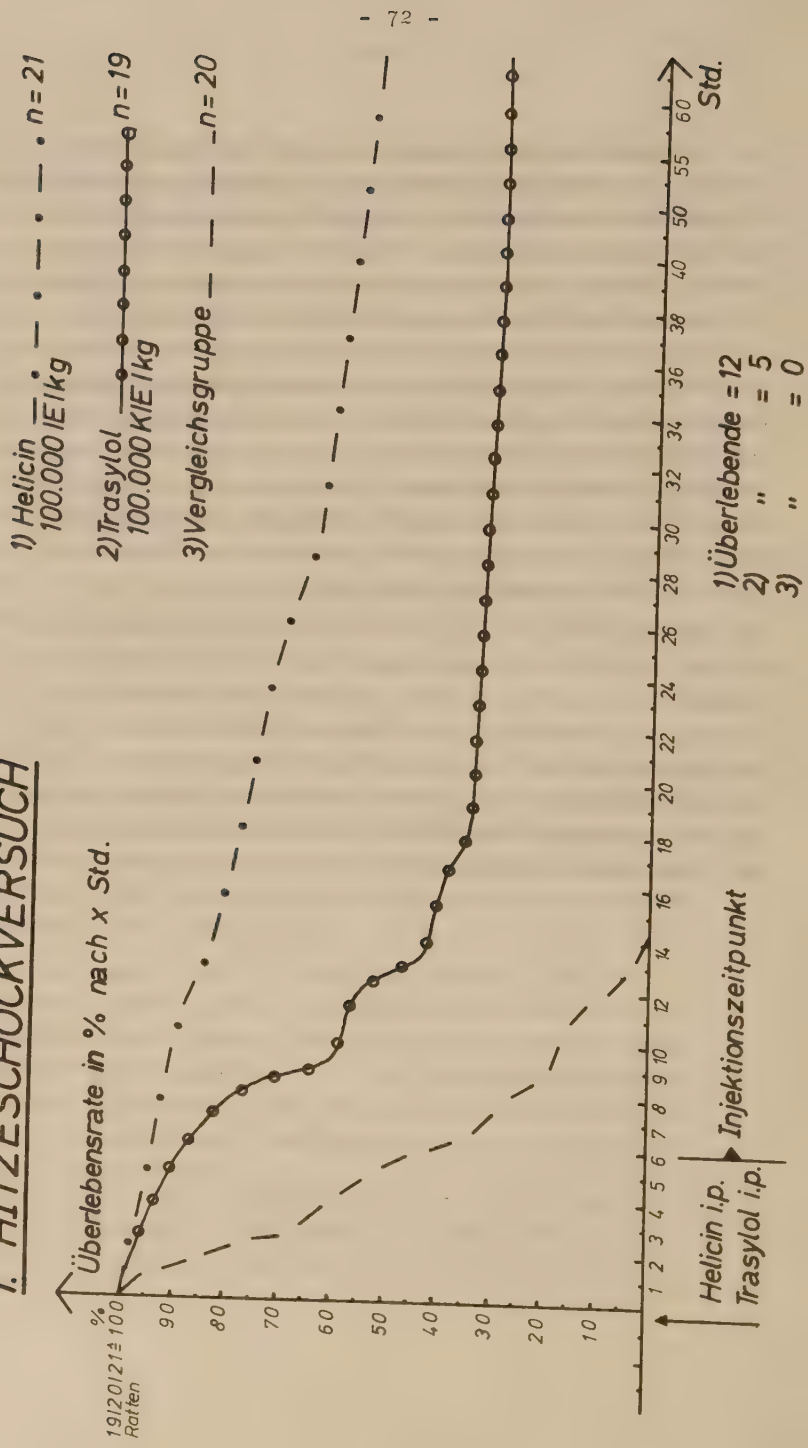
Der Test wurde nach 60 Std. abgebrochen, d.h. die bis dahin noch nicht gestorbenen Tiere wurden als überlebend betrachtet. Eine Signifikanz besteht dann, wenn das Testergebnis $T < -1$ ist. Kein signifikanter Unterschied zwischen zwei Versuchsgruppen liegt dann vor, wenn die T-Werte zwischen +1 und -1 liegen.

- Bei $T < -1,645$ Signifikanz auf dem 5%-Niveau;
- bei $T < -1,965$ Signifikanz auf dem 2%-Niveau;
- bei $T < -2,326$ Signifikanz auf dem 1%-Niveau.

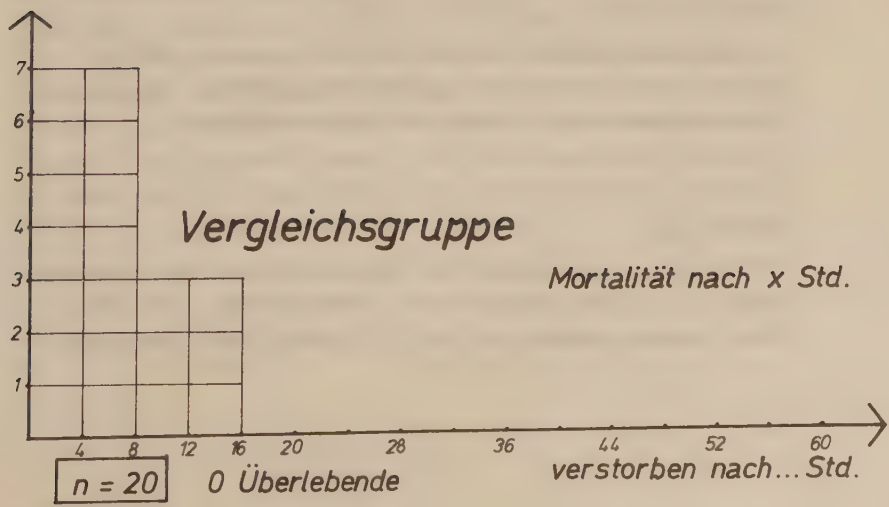
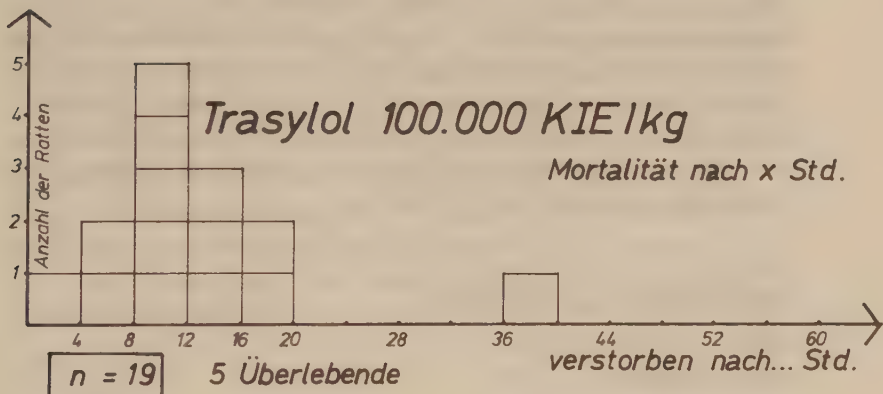
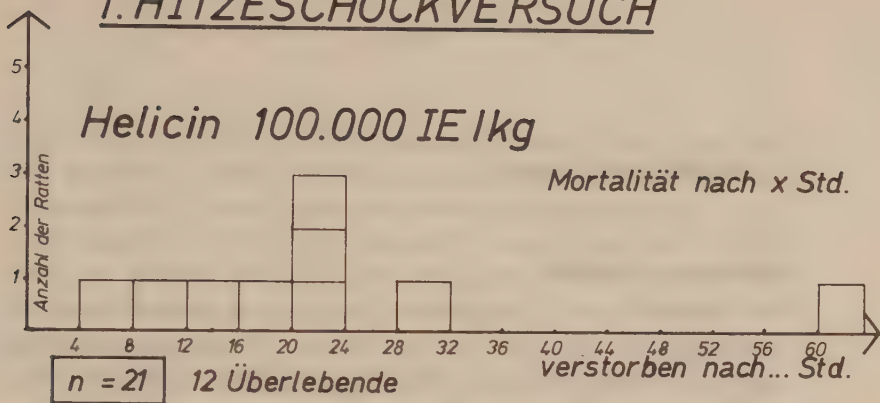
Zum statistischen Aussagewert unserer Ergebnisse ist folgendes zu bemerken: Die Versuchsgruppen umfaßten bis auf zwei Ausnahmen 20 Tiere; der Vergleichsgruppe zu den Versuchen lagen immer 20 Ratten zugrunde. Für eine aussagekräftige Statistik sind diese Zahlen zwar relativ gering (pro Berechnung 40 Tiere); vergleicht man sie jedoch mit anderen wissenschaftlichen Veröffentlichungen über ähnliche Tierexperimente, so sind unsere Versuchsgruppen meist doppelt so umfangreich wie diese. Außerdem war der Kurvenverlauf bei verschiedenen Gruppen, die die gleichen Mengen Inhibitor zur gleichen Zeit (z.B. 10 Min. vor der Verbrühung) appliziert bekamen (Trasylolgruppen), sehr ähnlich, was für die Brauchbarkeit unserer Methode spricht.

Bei der Gegenüberstellung von Trasylol zu Helicin wurde der T-Wert $-2,425$ errechnet; Trasylol zur Vergleichsgruppe: $T = -4,084$; Helicin zur Vergleichsgruppe: $T = -3,954$. Das bedeutet: Signifikanter Unterschied in der Überlebensrate bei der Gegenüberstellung Trasylol zu Helicin zugunsten des Helicin. Eine noch höhere Signifikanz wurde natürlicherweise bei der Aufrechnung beider Inhibitoren gegen die Vergleichsgruppe ermittelt.

1. HITZESCHOCKVERSUCH



1. HITZESCHOCKVERSUCH



11.

2. Hitzeschockversuch

11.1.

Trasylo1 - Helicin

Das Ergebnis des 1. Versuches, in dem die therapeutischen Wirkungen von Trasylo1 und Helicin im Überhitzungsschock bezüglich Überlebensrate und Überlebenszeit erstmals gegenübergestellt wurden, fiel eindeutig zugunsten des Helicin aus. Da es sich bei unseren Versuchen um biologische Tests handelte, in denen Faktoren wie z.B. Witterungsschwankungen, Fehler von seiten der Substanz oder des Versuchsablaufs eine Verfälschung der Ergebnisse herbeiführen können, entschlossen wir uns, den Versuch zu wiederholen. Wir wählten absolut gleiche Versuchsbedingungen, um die so erhaltenen Werte mit denen der ersten Versuchsreihe vergleichen zu können.

11.1.1.

Durchführung des Versuches

Anzahl der Tiere : 40.

Trasylo1gruppe : 20.

Helicingruppe : 20.

Gewicht : 200 ± 5 g.

Verbrühungsdauer : 30 Sek. bei 93°C .

Als Applikationsmenge wurden wiederum 100.000 KIE/kg Trasylo1 bzw. 100.000 IE/kg Helicin gewählt; der Injektionszeitpunkt lag 10 Min. vor der Verbrühung.

11.1.2.

Ergebnisse

60 Stdn. nach dem Setzen des Schocks zeigte die Helicingruppe 11, die Trasylo1gruppe 6 Überlebende auf. Diese Tiere wurden, ebenso wie im 1. Versuch, noch tagelang be-

obachtet, wobei keine Anzeichen einer eventuell sich später manifestierenden Schädigung festgestellt wurden. Das Endergebnis dieses Versuches bedeutet gegenüber der Vergleichsgruppe (= 100% Mortalität) eine prozentuale Senkung der Mortalitätsrate bei Trasylol auf 70% und bei Helicin auf 45%.

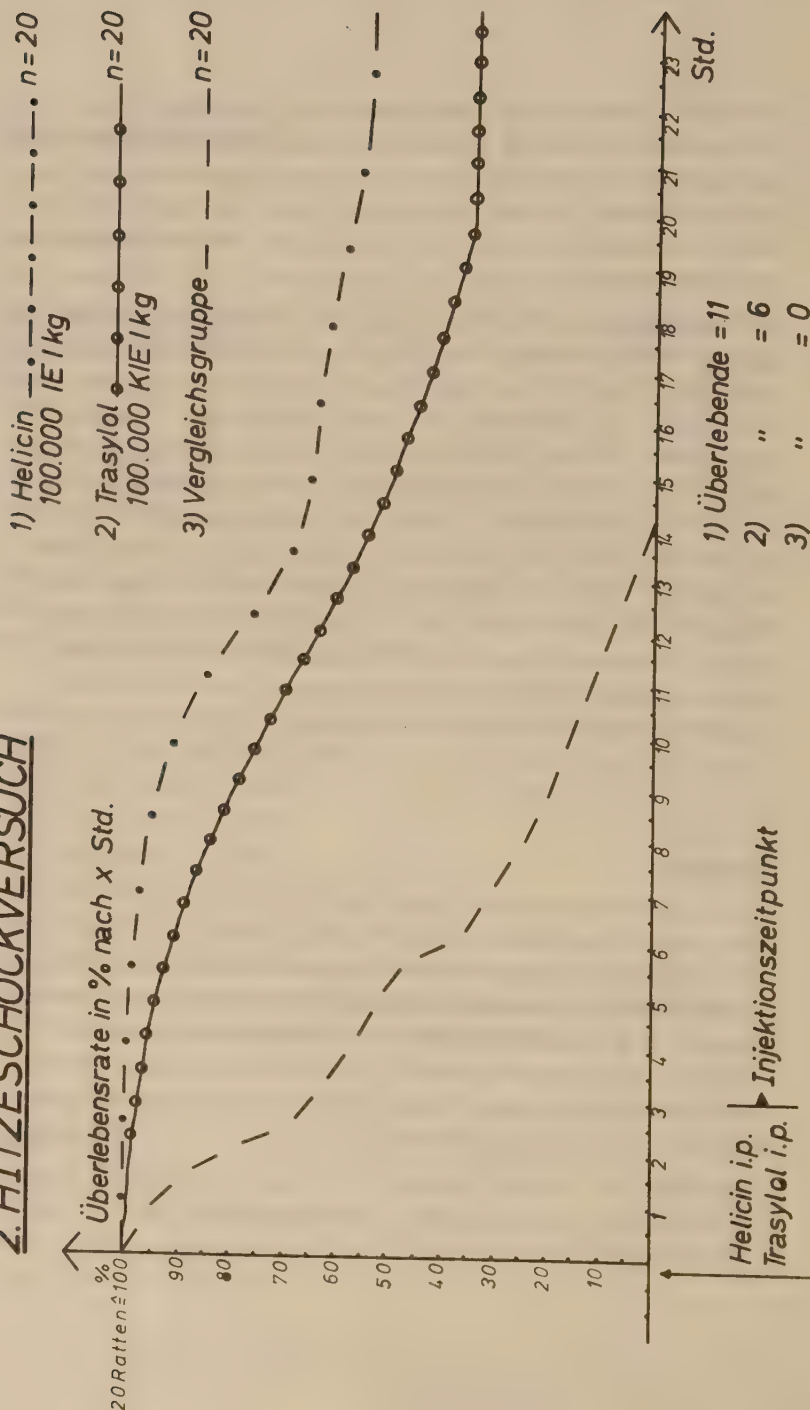
Der Kurvenverlauf und die Diagramme (S.76+77) zeigen, daß in den ersten 8 Stdn. nach dem Trauma kein Tier der Helicingruppe und 3 Tiere der Trasylolgruppe gestorben waren. Vergleicht man die Kurven und Diagramme des 1. und 2. Versuches, so ergibt sich eine weitgehende Übereinstimmung: Bei der Trasylolgruppe des 1. Versuches waren bis zur 8. Std. ebenfalls 3, bei der Helicingruppe 1 Tier gestorben. Betrachtet man die Versuchszeit zwischen der 8. und 24. Std., so findet man beim Helicin 9 und beim Trasylol 10 tote Tiere. Stellt man diese Zahlen denen des 1. Versuches gegenüber, so ergibt sich für diesen Zeitintervall wiederum Übereinstimmung beim Trasylol (10 Verstorbene) und eine Annäherung der Werte beim Helicin (6 Verstorbene).

11.1.3.

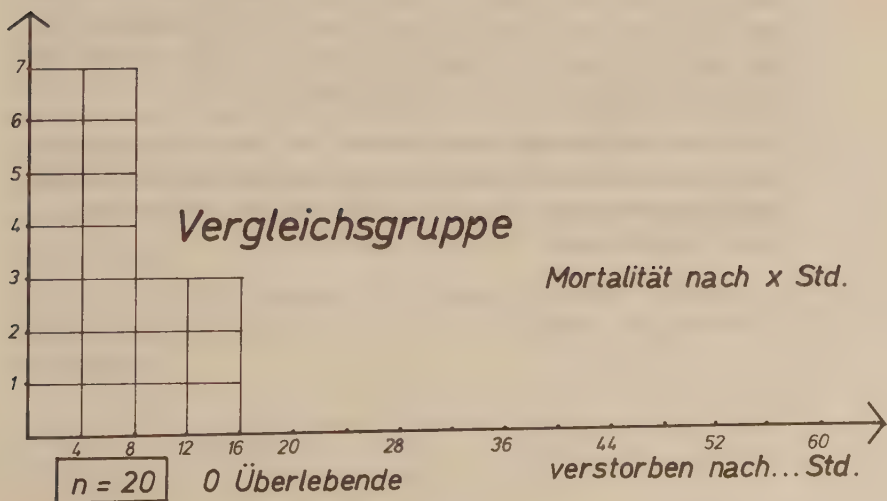
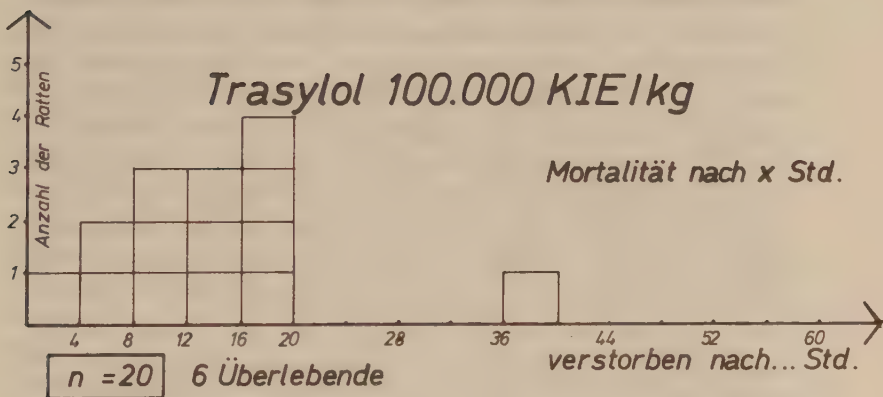
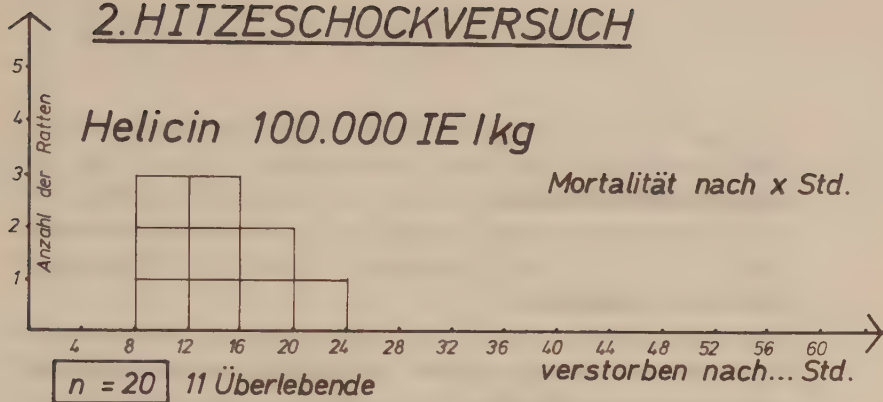
Statistik

Die statistische Auswertung des Versuches zeigte eine deutliche Signifikanz beim Vergleich Helicin - Trasylol ($T = -2,570$), ebenso bei der Gegenüberstellung beider Inhibitoren zur Vergleichsgruppe (Trasylol - Vergleichsgruppe: $T = -4,250$; Helicin - Vergleichsgruppe: $T = -4,780$). Das Ergebnis zeigt, daß auch in diesem Versuch mit Helicin eine signifikant höhere Überlebensrate als mit Trasylol erreicht wurde.

2. HITZESCHOCKVERSUCH



2. HITZESCHOCKVERSUCH



12.

3. Hitzeschockversuch

12.1.

Trasylol - Leupeptin

Die meisten Inhibitoren, die proteolytische Enzyme hemmen, haben Molekulargewichte von 5000 und darüber. Dagegen ist der von UMEZAWA (139) entdeckte und isolierte Inhibitor Leupeptin eine extrem niedermolekulare Verbindung (Formel S. 29). Leupeptin hemmt die Thrombokinase-reaktion, die Fibrinogeno-, die Fibrino- und die Proteolyse. Besondere Beachtung verdient die Tatsache, daß Leupeptin nur bei einigen Arten die Blutgerinnung hemmt (Mensch, Kaninchen), bei anderen nicht (Mäuse, Ratten, Hunde). Da Trasylol und Leupeptin in vitro imstande sind, weitgehend die gleichen Reaktionen zu hemmen und da bei diesen Versuchen sehr große Ähnlichkeiten der Hemmspektren beider Substanzen festgestellt wurden (siehe S. 30), entschlossen wir uns, Leupeptin gegen Trasylol im Hitzeschockversuch zu testen. Dadurch, daß das Leupeptin wie das Trasylol sowohl die proteolytischen als auch die esterolytischen Wirkungen verschiedener Proteinasen hemmt, erschien es uns als besonders interessante Substanz. Außerdem reizte es uns, einen Inhibitor zu erproben, der bei Bewährung aufgrund seines niedermolekularen Charakters sicher leichter herzustellen sein dürfte als die bisher bekannten Proteinasenhemmer.

An dieser Stelle soll noch einmal auf die Tatsache hingewiesen werden, daß auch das Leupeptin eine ödemhemmende Wirkung besitzt, was besonders bei der Behandlung eines Hitzetraumas von Bedeutung ist.

Bezüglich der wirksamen Dosis verhält sich das Leupeptin wie Trasylol und Helicin: Weder mit einer niedrigen (25 mg/kg) noch mit einer hohen (600 mg/kg), sondern mit einer mittleren Dosis (120 mg/kg) waren die besten experimentellen Erfolge zu erzielen (139).

12.1.1.

Durchführung des Versuches

Auch bei diesem Versuch verwendeten wir insgesamt 40 Ratten. Ihr Gewicht lag bei 200 ± 5 g. Sowohl die Leupeptin- als auch die Trasylolgruppe umfaßte jeweils 20 Tiere. Verbrühungsdauer: 30 Sek. bei 93°C .

In Vorversuchen, die der Ermittlung der Applikationsmenge dienten, stellten wir fest, daß die günstigsten Ergebnisse mit Dosen zwischen 110 mg/kg und 160 mg/kg Leupeptin bei intraperitonealer Injektion zu erreichen waren. Daher wählten wir bei diesem Versuch 160 mg/kg Leupeptin. Von diesen 160 mg/kg wurden 80 mg/kg 10 Min. vor Versuchsbeginn injiziert; die anderen beiden Injektionen von jeweils 40 mg/kg erfolgten 30 Min. bzw. 90 Min. nach Setzen des Schocks. Daß wir die Gesamtdosis in drei Einzeldosen aufteilten und verabreichten, hatte folgenden Grund: Wie aus der Verteilungskurve (S. 32) hervorgeht, erreicht die Konzentration einer injizierten Leupeptinmenge im Serum bereits nach $1/2$ Std. ihr Maximum und fällt dann so stark ab, daß 4 Stdn. post injektionem nur noch ein Fünftel der ursprünglichen Menge zirkuliert. Gleichzeitig steigt die Ausscheidung im Urin entsprechend stark an. Um diesen Tatsachen Rechnung zu tragen, wählten wir die Applikation von Teilmengen, um so ein längeres Verbleiben des Inhibitors im Organismus zu erreichen.

Als Trasyloldosis wählten wir wieder 100.000 KIE/kg, um diesen Versuch auch mit den vorhergehenden vergleichen zu können.

12.1.2.

Ergebnisse

60 Stdn. nach der Verbrühung lebten noch 5 Tiere der Trasylol- und 3 der Leupeptingruppe. Prozentual gegenüber der Vergleichsgruppe (= 100% Mortalität) bedeutet das eine Senkung der Mortalitätsrate bei Trasylol auf 75% und bei Leupeptin auf 85%. Die Kurven und Diagramme (S.81+82) zeigen, daß von Versuchsbeginn bis zur 8. Std. in beiden Gruppen bereits 7 Tiere verstorben waren. Hieraus ist ersichtlich, daß in diesem Versuch in den ersten Stunden die Mortalitätsrate höher lag als im 1. und 2. Versuch. Betrachtet man den weiteren Verlauf des Diagramms, so zeigt sich, daß auch dieses Mal wieder bis zur 20. Std. die meisten Tiere verstorben waren, wie das auch in den vorbergehenden Versuchen der Fall gewesen ist. Es handelt sich bei diesem Experiment also nur um eine leichte zeitliche Verschiebung in der Mortalität während der ersten Stunden; das Endresultat (bei der Trasylolgruppe) weist wiederum weitgehende Übereinstimmung auf.

12.1.3.

Statistik

Die statistische Berechnung Trasylol - Leupeptin erbrachte einen T-Wert von 0,0862 und zeigte damit keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Substanzen auf. Trasylol - Vergleichsgruppe: $T = -2,545$; Leupeptin - Vergleichsgruppe: $T = -2,218$, d.h. in beiden Fällen hohe Signifikanz.

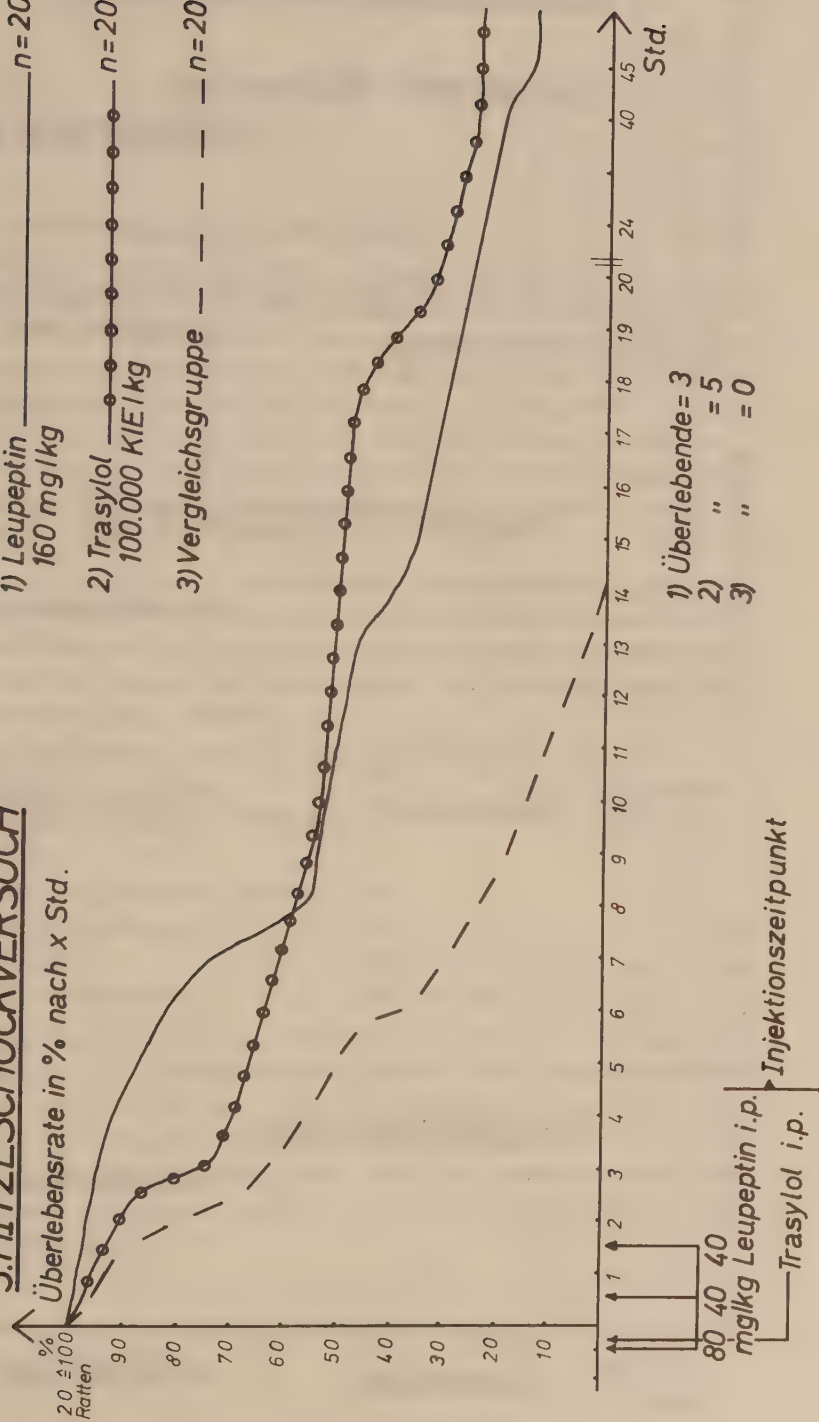
3. HITZESCHOCKVERSUCH

Überlebensrate in % nach x Std.

1) Leupeptin _____ n=20
160 mg/kg

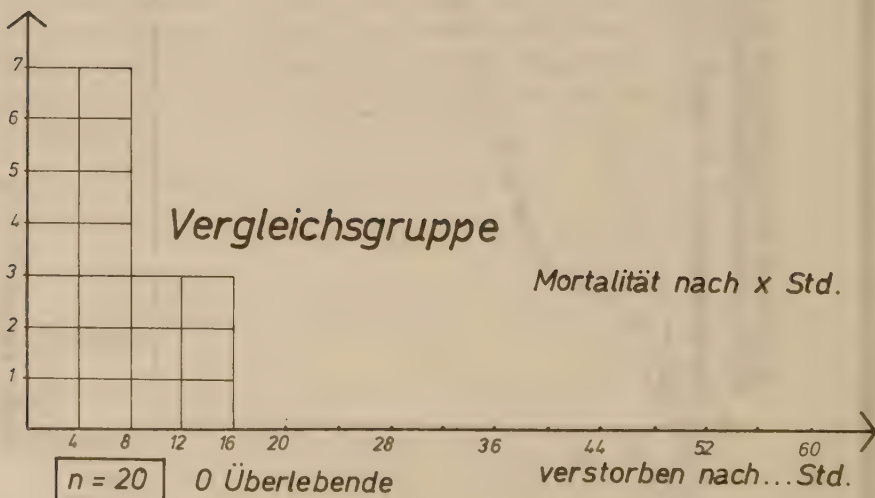
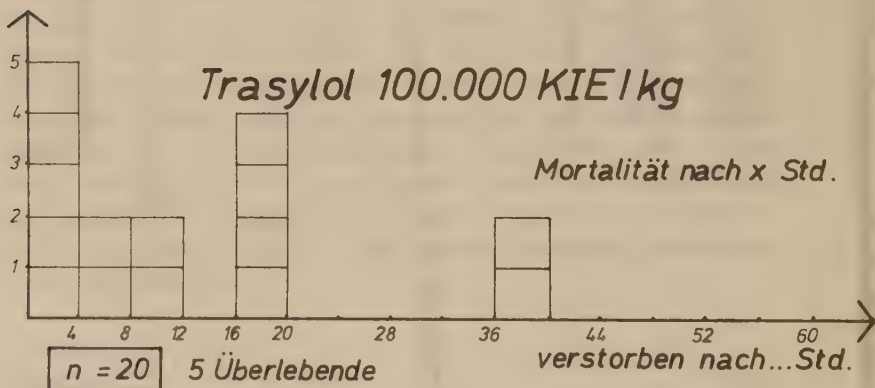
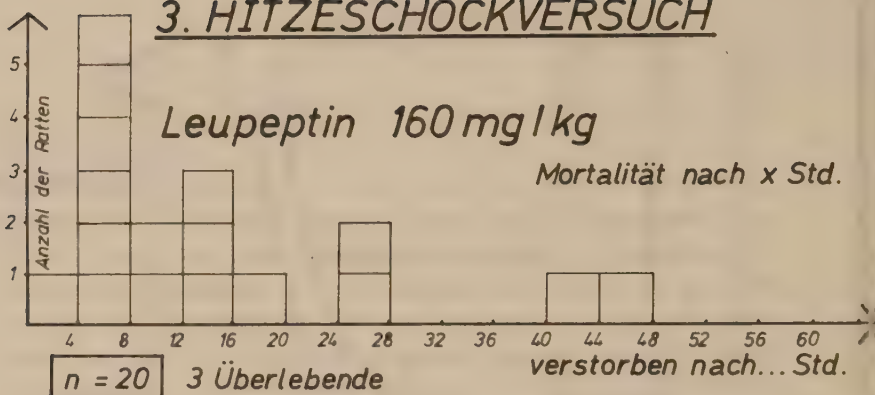
2) Trasylol _____ n=20
100.000 KIE/kg

3) Vergleichsgruppe - - - - n=20



1) Überlebende = 3
2) " = 5
3) " = 0

3. HITZESCHOCKVERSUCH



13.

4. Hitzeschockversuch

13.1.

Trasylo1/Leupeptin - Leupeptin

Da die Gegenüberstellung Leupeptin und Trasylo1 im 3. Hitzeschockversuch auch bezüglich des Leupeptin ein gutes Ergebnis gebracht hatte, entschlossen wir uns, Trasylo1 und Leupeptin zu kombinieren. Wir hofften, so die günstigen Wirkungen des Trasylo1 auf das initiale Stadium des Schocks, die durch die konstanten Ergebnisse der oben beschriebenen Versuche zum Ausdruck kamen, ausnutzen und durch die Kombination mit Leupeptin sogar noch verbessern zu können.

Da das Trasylo1 bei den bisherigen Versuchen seine Wirksamkeit und Zuverlässigkeit ausreichend bewiesen hatte, wählten wir es dieses Mal nicht als Vergleichspharmakon, sondern setzten dafür Leupeptin in einer geringeren Dosis als im 3. Versuch ein.

13.1.1.

Durchführung des Versuches

Anzahl der Tiere	: 40.
Trasylo1/Leupeptingruppe	: 20.
Leupeptingruppe	: 20.
Gewicht	: 200 ± 5 g.
Verbrühungsdauer	: 30 Sek. bei 93°C .

Beim Kombinationsversuch Trasylo1/Leupeptin applizierten wir 100.000 KIE/kg Trasylo1 und 40 mg/kg Leupeptin 10 Min. vor der Verbrühung. - Bei der Leupeptinreihe unterteilten wir die Gesamtdosis von 120 mg/kg in zwei Einzeldosen zu 80 mg/kg und 40 mg/kg, von denen die größere 10 Min. vor Setzen des Schocks und die kleinere 30 Min. danach verabreicht wurde.

13.1.2.

Ergebnisse

60 Stdn. nach dem Trauma wies die Kombinationsgruppe 6, die Leupeptingruppe 5 Überlebende auf. Das bedeutet gegenüber der Vergleichsgruppe (= 100% Mortalität) eine Senkung der Mortalitätsrate auf 70% beim Kombinationsversuch und auf 75% bei der Leupeptingruppe. Der Kurvenverlauf und die Diagramme (S.85+86) zeigen, daß bereits in den ersten 12 Stdn. sowohl beim Kombinationsversuch als auch bei der Leupeptingruppe die höchste Mortalität zu verzeichnen war (Leupeptin 11, Trasylol/Leupeptin 12 verstorbene Tiere). Bis zur 24. Std. starben in der Leupeptingruppe weitere 4 und in der Trasylol/Leupeptingruppe 2 Tiere.

So steht auch der 4. Versuch in dieser Beziehung im Einklang mit den vorherigen, in denen eindeutig zum Ausdruck kam, daß sich die schwerste Phase der Verbrennungs-krankheit in unserem Schockmodell während des ersten Tages und in der darauffolgenden Nacht abspielt. Ist diese Zeit überstanden, kommt es nur noch in Ausnahmefällen zu einem tödlichen Ausgang.

13.1.3.

Statistik

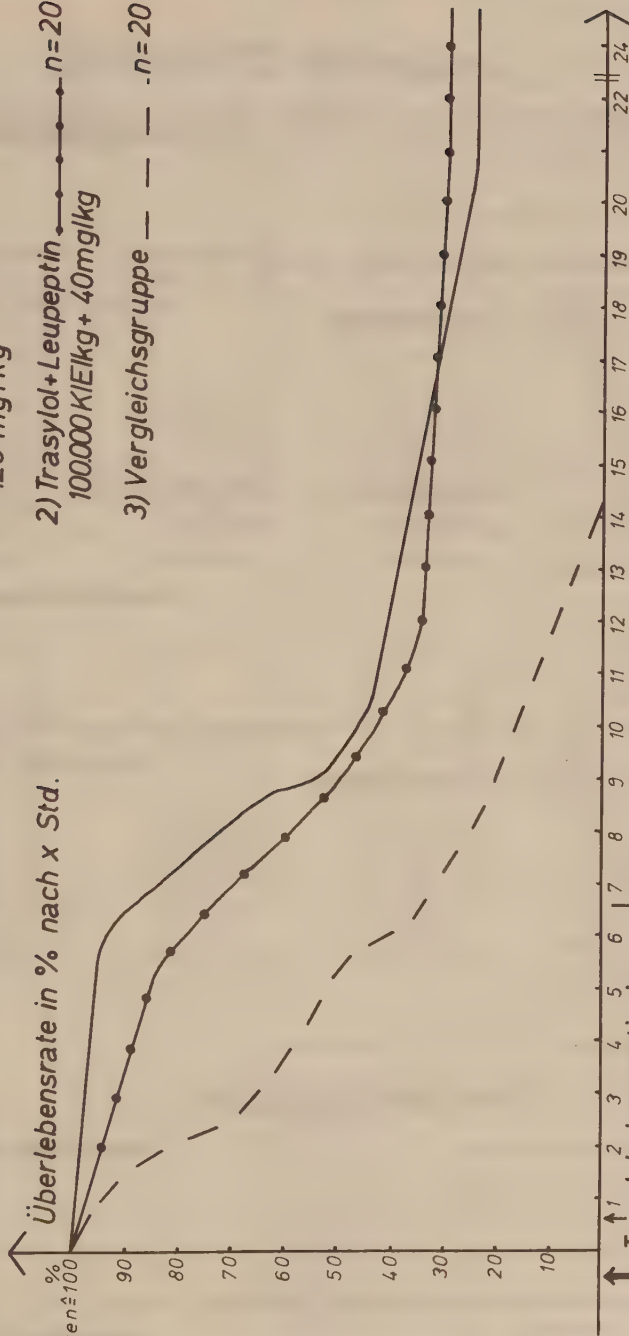
Die Berechnung Trasylol/Leupeptin zur Leupeptingruppe ($T = 0,530$) zeigte keine Signifikanz zwischen beiden Substanzen. Trasylol/Leupeptin zur Vergleichsgruppe: $T = -4,564$ bzw. Leupeptin zur Vergleichsgruppe: $T = -3,417$, d.h. Signifikanz bei beiden Gegenüberstellungen.

4. HITZESCHOCKVERSUCH

- 1) Leupeptin _____ n = 20
120 mg/kg
- 2) Trasylol + Leupeptin _____ n = 20
100.000 KIE/kg + 40mg/kg
- 3) Vergleichsgruppe --- --- n = 20

Überlebensrate in % nach x Std.

20
Ratten ± 100



1) Überlebende = 5

2) " = 6

3) " = 0

Injektionszeitpunkte

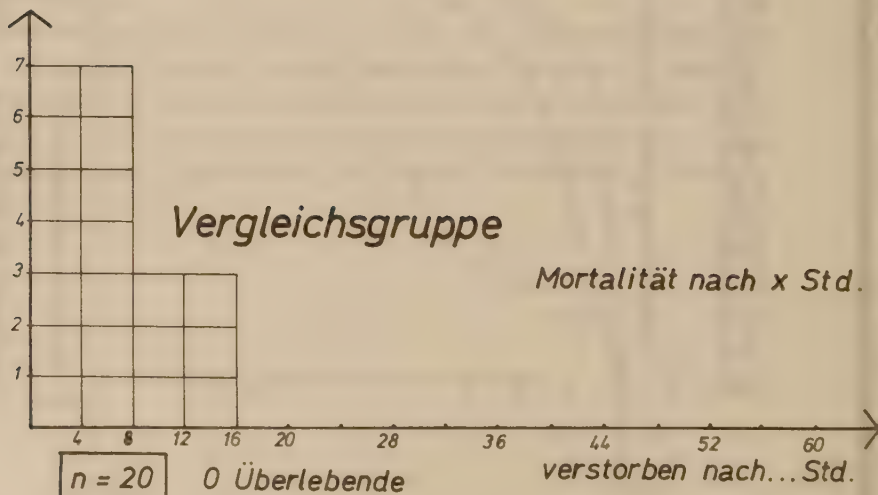
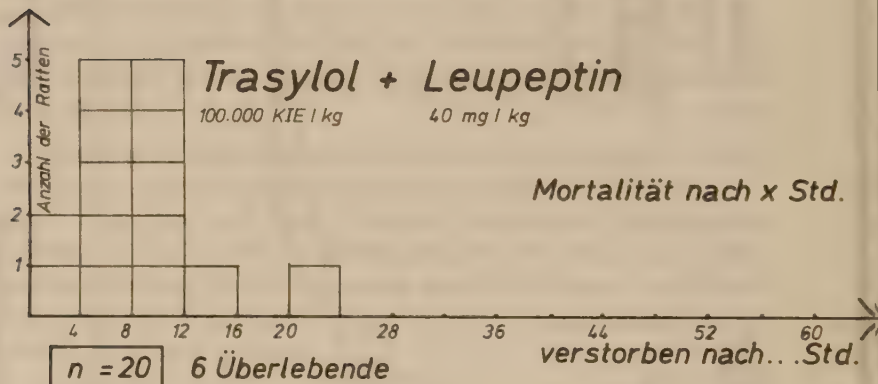
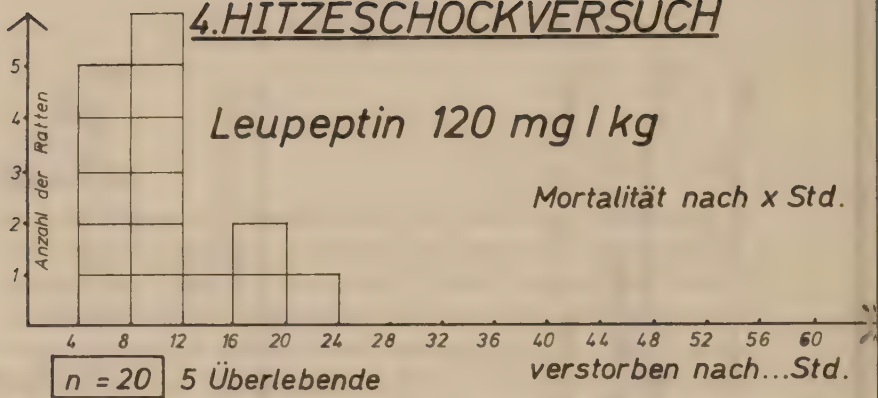
Trasylol + Leupeptin i.p.

Leupeptin 80 mg/kg i.p.

Leupeptin 40mg/kg s.c.

Std.

4. HITZESCHOCKVERSUCH



VERGLEICH DER MORTALITÄTSRATEN



Vergleichs-
gruppe



Helicin
100000 IE/kg



Helicin
100.000 IE/kg



Trasyol
+ Leupeptin



Trasyol
100000 KIE/kg



Trasyol
100.000 KIE/kg



Trasyol
100000 KIE/kg



Leupeptin
160 mg/kg



Leupeptin
120 mg/kg

14.

Histologie

Um die positiven Versuchsergebnisse, die insbesondere bei Applikation von Helicin und Trasylol erzielt wurden (Versuche Nr. 1 und 2), näher zu untersuchen, entschlossen wir uns, einige Organe der auf diese Weise behandelten sowie der Tiere der Vergleichsgruppen zu entnehmen und für eine histologische Bewertung aufzuarbeiten. Als typische Schockorgane wählten wir Leber, Niere und Lunge. Auf diesem Wege erhofften wir die Gründe für die signifikant höheren Überlebensraten der Ratten in den Versuchen mit Helicin als in denen mit Trasylol herauszufinden.

Die histologische Auswertung erfolgte im Pathologischen Institut der Universität München durch Herrn Dr. REMBERGER, dem wir an dieser Stelle für seine bereitwillig gewährte Hilfe bei der Beurteilung der Organpräparate danken. Ferner gilt unser Dank Frau CALVÖR (Labor Prof. SCHAUER), die Einbettung, Schnitt und Färbung der Präparate vornahm.

14.1.

Methodik

Um die Schockorgane für die histologische Untersuchung zu erhalten, wurden, nachdem die eigentlichen Versuchsreihen bereits ausgewertet waren, absolut äquivalente Versuche mit jeweils 10 Tieren für die entsprechende Gruppe (Trasylol, Helicin, Kontrollgruppe = keine Verbrühung und keine Therapie; Vergleichsgruppe = Verbrühung und keine Therapie) durchgeführt. Hierbei wurden Verbrühungsdauer, Applikationszeitpunkt und -menge exakt reproduziert. Der Unterschied zu den eigentlichen Versuchsreihen bestand darin, daß alle Tiere für die Histologie nach genau 10 Stdn. getötet und entblutet

wurden, während die Tiere der vorausgegangenen Versuchsreihen spontan ad exitum kamen.

Da von den jeweils 10 Tieren einige v o r der 10. Std. nach der Verbrühung starben und so die Anzahl der Ratten in den einzelnen Gruppen unterschiedlich war, wurden die semiquantitativ ermittelten Organveränderungen durch die jeweilige Anzahl der Ratten aus der entsprechenden Versuchsgruppe dividiert. Daraus geht hervor, daß die in Abb. 23 ausgewiesenen Zahlenwerte nicht als direkte Zahlen, sondern als Schockindices anzusehen sind.

Die Entblutung erfolgte schonend nach vorheriger, genau dosierter Chloralhydratnarkose. Nach Eröffnung des Peritoneums wurde die Bauchaorta punktiert und das Blut auf diesem Wege abgesaugt. Anschließend wurden Leber, Niere und Lunge entnommen und in 10 %igem Formalin fixiert. Die histologischen Schnitte wurden im üblichen Verfahren hergestellt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

14.1.2.

Begründung der Methodik

Würde man die s p o n t a n gestorbenen Tiere für die Histologie aufarbeiten, wie von HEY und LANGER (57) beschrieben, wäre das Ergebnis nach unseren Überlegungen nicht einwandfrei vergleich- und interpretierbar, da sich die Organmanifestationen des Schocks m i t d e r Z e i t ändern. Auf diese Weise bekäme man jeweils nur eine Momentaufnahme nach unterschiedlicher Schockdauer. Ein weiterer Nachteil bestände darin, daß die Tiere nach einem spontanen Tod, der nicht sofort bemerkt wird, nicht mehr entblutet werden könnten und eine sofortige Organentnahme meist nicht gewährleistet wäre. Außerdem würden bei einem solchen Vorgehen zusätzlich zum Schockgeschehen postmortale Vorgänge (z.B. Thrombenbildungen u.a. Organveränderungen) ablaufen, die zu einer Verfälschung des histologischen Bildes führen würden.

Daher wählten wir die uns von Herrn Prof. SCHAUER empfohlene und von LORTHIOIR, LEY und SCHNELLS (86) angewandte, oben beschriebene Methode (Entblutung zu einem definierten Zeitpunkt), um möglichst optimale, vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Ferner sind wir davon überzeugt, daß ein weiterer Vorteil unseres Vorgehens gegenüber anderen Arbeitsgruppen (86) in der von uns gewählten Narkoseart liegt. Wir verwandten Chloralhydrat und nicht Äther, da sich 1. die Chloralhydratnarkose - im Gegensatz zum Äther - genau dosieren läßt und es 2. zu keinen Lungenveränderungen, wie sie nach Äther (z.B. Hyperämien) beschrieben wurden, kommt. Die etwas umständliche und arbeitsaufwendige Methode, die Entblutung mittels Punktion der Bauchaorta vorzunehmen, wählten wir, um eine Blutaspiration, wie sie häufig nach Dekapitation beobachtet wurde, zu vermeiden.

An dieser Stelle soll noch besonders darauf hingewiesen werden, daß Herr Dr. REMBERGER bei der histologischen Bewertung nicht wußte, welches Organ mit welchem Inhibitor behandelt bzw. unbehandelt war, so daß es sich um echte Doppelblindversuche handelte.

14.2.

Parameter der histologischen Beurteilung

An den genannten Organen wurden folgende pathologischen Veränderungen semiquantitativ ausgewertet (Abb. 23):

- Lunge: Hyperämie, Parenchymblutungen, intravasale Thromben (Thrombozyten und Fibrin), Endothelnekrosen, Gefäßwand-, perivaskuläres- und interstitielles Ödem, Teillatelektasen.
- Niere: Schockäquivalente (Tubulusdilatation, Abflachung der Tubulusepithelien, Kollaps der Glomerulumschlingen, Tubulusnekrosen, Erythrozyten- und Proteinzyylinder, Hyperämie und intravasale Thromben.
- Leber: Hyperämie, Thromben, Parenchymnekrosen und Endothelnekrosen.

14.3.

Ergebnisse

14.3.1.

Lunge

Hier zeigte sich in bezug auf Hyperämie, Teillatelektasen sowie interstitielles-, perivaskuläres- und Gefäßwandödem kein signifikanter Unterschied innerhalb der einzelnen Versuchstiergruppen (Trasylool-, Helicin- und Vergleichsgruppe). Gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren fand sich jedoch erwartungsgemäß eine signifikante Erhöhung der Hyperämie und des interstitiellen-, perivaskulären- und Gefäßwandödems. Parenchymatöse Blutungen traten bei den behandelten Versuchstieren seltener auf, wobei sie nach Trasylool halb so häufig und nach Helicin etwa um ein Drittel reduziert waren.

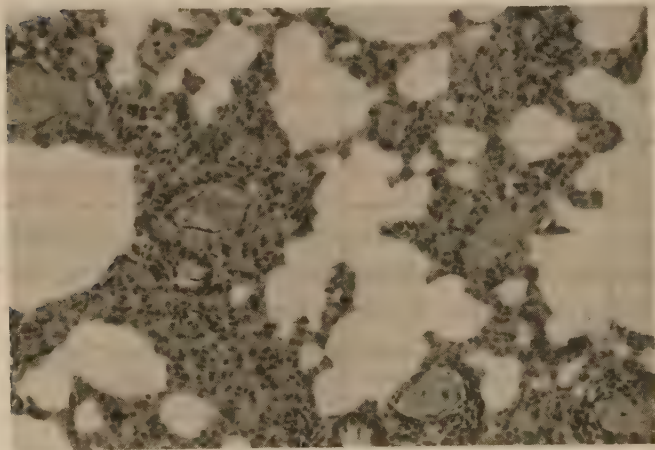


Abb. 24: Lungenveränderungen nach Verbrühungsschock: Thromben, Teillatelektasen, interstitielles Ödem, Hyperämie, dystelektatische Bezirke.

Interessanterweise zeigte sich nach Trasylol und nach Helicin dieselbe Verminderung der intravasalen Thromben (auf etwa zwei Drittel der nicht therapierten Versuchstiere). Gefäßendothelnekrosen waren nach Trasylol und Helicin jeweils um etwa ein Drittel gegenüber den unbehandelten, verbrühten Vergleichstieren reduziert.

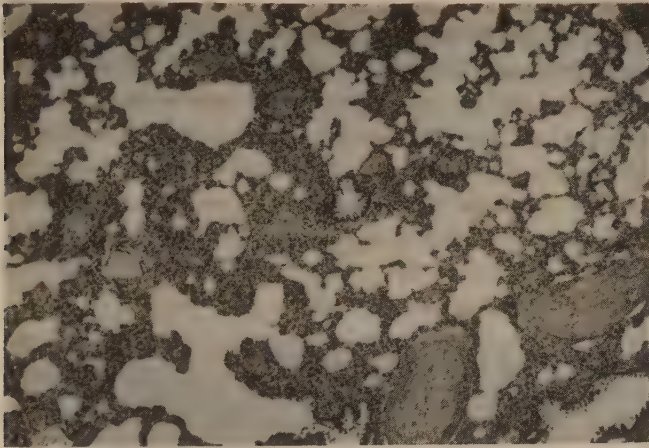


Abb. 25: Lungenveränderungen nach Verbrühungsschock: Thromben, Teilatelektasen, interstitielles Ödem, Hyperämie, dystelektatische Bezirke.

14.3.2.

Niere

Hier fanden wir keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstiergruppen bezüglich Hyperämie, Tubulusdilatation und Glomeruluskollaps; diese Parameter waren lediglich bei den Kontrolltieren ohne Verbrennungsversuch ganz niedrig bzw. nicht vorhanden. Tubulusnekrosen finden sich nach Trasylol und Helicin nur etwa halb so häufig wie bei der Vergleichsgruppe. Die intravasalen Thromben waren nach Trasylol etwa um das Vierfache, nach Schneckeninhibitor um das Achtfache vermindert. Insgesamt ist die Zahl der intravasalen Mikrothromben wesentlich geringer als in der Lunge. - Erstaunlicherweise fanden sich bei den behandelten Versuchstieren Erythrozyten- und Eiweißzylinder häufiger als bei den unbehandelten Tieren der Vergleichsgruppe, und zwar nach Trasylol fast dreimal, nach Helicin fast doppelt so häufig.

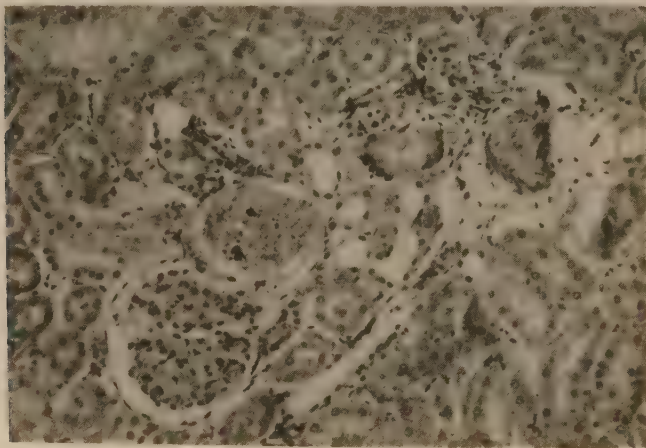


Abb. 26: Nierenveränderungen nach Verbrühungsschock: frisches fibrinöses Material, dilatierte Venolen mit Erythrozyten, Blutaustritte, Hyperämien.

14.3.3.

Leber

Hier fanden wir auch bei den Tieren der Kontrollgruppe immer eine mäßige Hyperämie; sie ist bei den Vergleichstieren mit Verbrennung um etwa das Doppelte gesteigert. Nach Trasylol und Helicin ist die Hyperämie um ca. ein Drittel gesenkt. Die intravasalen Mikrothromben waren lediglich nach der Trasylol-Therapie um etwa die Hälfte gesenkt, während sie nach Helicin fast gleich blieben; insgesamt ließen sich jedoch nur wenige Mikrothromben, ähnlich wie in der Niere, nachweisen. Endothelnekrosen der portalen Gefäße waren nach Helicin um die Hälfte, nach Trasylol sogar um den Faktor 10 reduziert. Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei den Parenchymnekrosen, wobei sie nach Helicin um ein Drittel, nach Trasylol um die Hälfte vermindert waren.

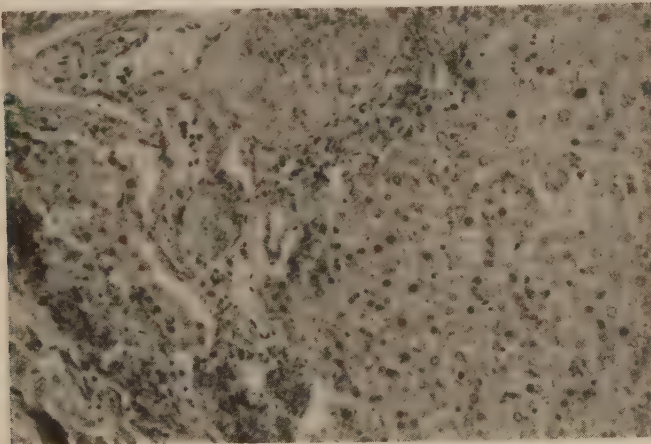


Abb. 27: Leberveränderungen nach Verbrühungsschock: massive Hyperämie, Fibrinablagerungen, Erythrozytenextravasate, hyperämische Kapillaren, gestaute Venolen, beginnende Parenchymnekrosen.

14.4.

Zusammenfassung

Auch histologisch und pathologisch-anatomisch ließen sich die experimentell signifikanten Erfolge mit Helicin und Trasylol gegenüber der Vergleichsgruppe im Verbrennungsschock voll bestätigen. Insbesondere Endothel- und Parenchymnekrosen, Blutungen und intravasale Mikrothromben waren seltener nachweisbar als bei den unbehandelten Tieren der Vergleichsgruppe.

Helicin und Trasylol erwiesen sich, beurteilt nach histologischen Parametern, als nahezu gleichwertig, wobei nach Helicinapplikation die Nieren- und Lungenwerte, nach Trasylol die Leberwerte teilweise günstiger ausfielen.

Da nach der Applikation von Trasylol im Schockversuch Nierenrindennekrosen beschrieben wurden (57) und außerdem Trasylol erheblich stärker als Helicin in der Niere gebunden wird und kumuliert (126), nehmen wir an, daß diese Kriterien für das wesentlich bessere Abschneiden der mit Helicin behandelten Tiere bezüglich der Überlebensraten verantwortlich sind.

15.

Diskussion

15.1.

1. und 2. Versuch: Trasylol - Helicin

Besondere Betonung verdient die Tatsache, daß mit Helicin, das erstmals im Tierexperiment getestet wurde, ein besseres Ergebnis zu verzeichnen war als mit dem seit langem erprobten Trasylol (Helicin-Überlebensrate 67% bzw. 65%; Trasylol-Überlebensrate 30% bzw. 26% in diesen beiden Versuchen). Das bedeutet, daß die Mortalität durch beide Pharmaka signifikant gesenkt werden konnte.

Aus Gründen des Quantitätsmangels war es leider nicht möglich, Helicin in Initialdosen und anschließenden Erhaltungsdosen zu applizieren; daher verzichteten wir auch beim Trasylol auf diese in der Klinik übliche Applikationsart, da das Ergebnis eines solchen Versuches keinen Vergleichswert besessen hätte.

Das Ergebnis dieser zwei Versuche zeigt, daß der Einsatz von Proteinaseinhibitoren im Schockgeschehen von erheblicher Bedeutung ist. Die bisherige Therapie, die bis zur Entdeckung der Proteinaseinhibitoren geübt wurde, war symptomatisch-physikalisch: Volumenersatz, O_2 -Versorgung, Kreislaufstabilisierung, Antibiotika. Mit den Proteinaseinhibitoren ist ein direkter Eingriff in das Enzymgeschehen und damit eine kausale Therapie möglich geworden.

Während es in der Vergleichsgruppe, die keinen Inhibitor verabreicht bekam, vermutlich sofort zu einer ungehemmten Freisetzung von Proteinase und damit zur Manifestation der Verbrennungskrankheit und dem daraus folgenden Schock kam, der durch die hohe Mortalitätsrate der ersten 8 Stunden = 14 tote Tiere seinen Ausdruck fand, lag die Mortalität in den beiden anderen Gruppen zu diesem Zeitpunkt ganz erheblich niedriger.

Diese Gegenüberstellung läßt erkennen, daß die Applikation und der frühe Applikationszeitpunkt eines wirksamen Pharmakons von größter Wichtigkeit sind.

Die Hauptsterberate lag bei den unbehandelten Tieren zwischen der 2. und 10. Stunde mit einem Maximum während der 2. und 3. Stunde nach Setzen des Schocks. Die mittlere Überlebenszeit dieser Vergleichstiere betrug 6 Stunden und 31 Minuten. Die Hauptschockereignisse laufen demnach ausgesprochen schnell ab und erreichen zwischen der 2. und 4. Stunde wahrscheinlich ihren Höhepunkt, was an dem rapiden Abfall dieser Überlebenskurve zu erkennen ist.

Nach der Applikation von Trasylol ist der stärkste Abfall in den entsprechenden Kurven zwischen der 6. und 12. Stunde (1. Versuch) bzw. der 8. und 18. Stunde (2. Versuch), also verzögert, zu verzeichnen. Trasylol und Helicin scheinen demnach in jedem Fall nach dem Schock zu den verschiedenen Kontrollzeiten bestimmte Wirkungen zu entfalten, was aus den Kurvendarstellungen anderer Arbeitsgruppen (75), die in größeren Zeitabständen kontrollierten und in erster Linie die Überlebensrate und nicht die Überlebenszeit registrierten, nicht immer zu eruieren war. Hier zeigte sich der Vorteil der intensiven Kontrolle (in den ersten 24 Stunden halbstündlich, anschließend bis zur 36. Stunde stündlich, danach alle 3 Stunden).

Nachdem wir Helicin appliziert hatten, verzeichneten wir einen stark verzögerten, relativ stetigen Abfall der Kurven. Sieht man die Helicin- und die Trasylolkurven als Ganzes und nicht in Zeituntereinheiten geteilt an, so läßt sich schon auf den ersten Blick bei dem gleichen Inhibitor eine weitgehende Ähnlichkeit im Verlauf feststellen. So differieren die beiden Trasylolversuche bezüglich der Mortalitätsrate lediglich um 4%, die des Helicin sogar nur um 2%. - Damit dürften die experimentellen Ergebnisse als gesichert gelten.

Besonders hervorzuheben ist die starke inhibierende Wirkung des Helicin auf das Schockgeschehen, gerade weil es sich um einen neuen, bisher unbekannten Inhibitor handelt. Betrachtet man die Unterschiede in der Wirkungsweise beider Inhibitoren, so erscheint dieses Ergebnis bei den gewählten Versuchsbedingungen verständlich: Die erheblich kürzere Vorinkubationszeit, das breitere Hemmspektrum, die höhere Säure- und Hitzestabilität sowie die nicht erfolgende Bindung an die Niere aufgrund der Basizität sind wahrscheinlich für das ausgezeichnete Resultat bei den Helicinversuchen ausschlaggebend und könnten darauf hinweisen, daß dieser neue niedermolekulare Inhibitor Hemmmechanismen besitzen muß, die denen des Trasylol eventuell überlegen sein dürften. Alle diese angeführten Eigenschaften führen wahrscheinlich zu einem schnelleren Einstellen des Enzymgleichgewichts; aufgrund verschiedener biochemischer Versuche (5) ist damit zu rechnen, daß sich auf ein tetramaleoyliertes Trasylol einige dieser vorteilhaften Eigenschaften des Helicin übertragen lassen. Die tierexperimentellen Versuche in dieser Richtung stehen allerdings noch aus.

15.2.

3. Versuch: Trasylol - Leupeptin

Das Ergebnis dieses Versuches zeigt, daß auch der Einsatz des zweiten neuen Inhibitors, Leupeptin, erfolgreich war. Gegenüber der Vergleichsgruppe (= 100% Mortalität) wurde diese Rate um 15%, bei dem parallellaufenden Trasylolversuch um 25% gesenkt. Trotz des prozentualen Unterschiedes zwischen beiden Inhibitoren erbrachte die statistische Berechnung dieses Experiments keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen zwei Substanzen. Daraus folgt, daß bei genügend großen Versuchsserien in etwa gleiche Erfolge erzielt werden dürften.

Wie schon aus der Versuchsbeschreibung hervorgeht, teilten wir bei der Leupeptinserie die zu injizierende Inhibitormenge in eine Initial- und zwei Erhaltungsdosen, da wir auf diese Weise eine zu schnelle Ausscheidung des Hemmstoffes vermeiden wollten. Von besonderer Wichtigkeit erschien uns in diesem Zusammenhang die Frage, ob und in welchem Ausmaß der durch die Verbrühung schwer geschädigte Organismus in der Lage ist, die 30 bzw. 90 Minuten nach dem Trauma gespritzten Inhibitormengen zu resorbieren. Bei der Obduktion der spontan gestorbenen Tiere dieser Versuchsreihe stellten wir fest, daß die Inhibitormenge der 2. und 3. Injektion zumindest zum Teil in der freien Bauchhöhle verblieben war. Wir schließen daraus, daß das Resorptionsvermögen der geschockten Tiere bereits kurz nach dem Trauma so stark vermindert ist, daß der Inhibitor nicht oder nur teilweise den eigentlichen Ort seiner Entfaltungsmöglichkeit - nämlich die Blutbahn - erreicht. Folglich erscheint es sinnlos, sich darum zu bemühen, die zirkulierende Menge des Leupeptin am Absinken zu hindern, da durch die herabgesetzte Resorption keine höhere Wirksamkeit des Inhibitors zu erreichen ist.

15.3.

4. Versuch: Trasylol/Leupeptin - Leupeptin

In diesem Versuch ließ sich der Erfolg, den wir mit der Leupeptingabe im 3. Versuch erzielten, sogar noch etwas verbessern (Senkung der Mortalitätsrate bezogen auf die Vergleichsgruppe um 25%). Der Kombinationsversuch Trasylol/Leupeptin zeigte nicht die von uns erwartete Steigerung der Überlebensrate gegenüber den "reinen" Trasylolserien, aber dennoch eine Senkung der Mortalitätsrate gegenüber der Vergleichsgruppe um 30%.

Somit brachte die Kombination ein annähernd identisches Ergebnis wie die Versuche, in denen ausschließlich Trasylol appliziert wurde. Der Grund für diese Annäherung dürfte in den sehr ähnlichen Hemmspektren beider Substanzen zu finden sein. Vermutlich sind die diesbezüglichen Mechanismen nahezu gleich, da sich sonst eine additive Wirkung hätte einstellen müssen, wie sie SPELSBERG (123) bei der Kombination von Trasylol mit Heparin sah.

Da die Ergebnisse der Leupeptinserien des 3. und 4. Versuches trotz zwei verschiedener Applikationsmengen (120 mg/kg bzw. 160 mg/kg) ähnlich waren, liegt die Vermutung nahe, daß es bei diesem Inhibitor in erster Linie darauf ankommt, daß die zu injizierende Menge innerhalb des von uns ermittelten optimalen Wirkungsbereiches liegt. Da Leupeptin einerseits schnell abgebaut und zum anderen bei Applikation *n a c h* erfolgter Schocksetzung (Erhaltungsdosen) nicht oder nur schlecht resorbiert wird, wäre eine erhebliche Verbesserung der Ergebnisse denkbar, wenn es gelänge, diese beiden Faktoren auszuschalten.

An dieser Stelle soll noch eine Beobachtung erwähnt werden, die zwar subjektiv ist, uns aber dennoch bemerkenswert erscheint: Die Tiere sowohl der Trasylol- als auch der Helicingruppen wirkten nach dem Erwachen aus der Narkose, also in schon verbrühtem Zustand, auffallend munterer und begannen auch sehr viel früher zu fressen und zu trinken als die Ratten der Leupeptinreihen; auch registrierten wir schon sehr früh nach dem Trauma bei den Tieren der beiden erstgenannten Gruppen lebhaftere Abwehrreflexe, wenn wir sie aus den Käfigen nahmen, die bei den Leupeptin-Ratten erst sehr viel später zu bemerken waren.

16.

Schlußfolgerungen

Eine spezifische Hemmwirkung des Trasylol, des Helicin und des Leupeptin auf die pathophysiologischen Mechanismen, die als Folge eines Schocks auftreten, wurde durch die oben beschriebenen Versuche nachgewiesen. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Applikation von Proteinaseinhibitoren im Schock von größter therapeutischer Bedeutung ist.

Unsere Versuche liefern einen indirekten Beweis dafür, daß dem Kallikrein-Kininsystem bei der Entstehung der Verbrennkrankheit und des Schocks eine wesentliche Rolle zukommt; denn die Anwendung von Proteinaseinhibitoren, die nachweislich (in vitro) hemmend auf dieses System wirken, brachte signifikant längere Überlebenszeiten bei den Versuchstieren. Auch LEWANDOWSKI (83), der im gleichen Schockmodell u.a. die Carboxypeptidase B, die den biologischen Effekt von Bradykinin und Kallidin 50- bis 100mal stärker hemmt als Chymotrypsin (30), erprobte, stellte fest, daß der Einsatz dieses Enzyms zur Verlängerung der Überlebenszeit und zur Minderung der Schocksymptome führte.

Als direkter Beweis für die wesentliche Beteiligung des Kininsystems am Schockgeschehen kann die Tatsache angesehen werden, daß die Applikation von Kallikrein bei gleichen Versuchsbedingungen eine signifikante Verkürzung der Überlebenszeit mit sich brachte (10).

Der Enzymtherapie sind jedoch Grenzen gesetzt. Viele Enzyme sind empfindliche, zum großen Teil durch Verdauungsenzyme abbaubare Proteine, was ihre orale Applikation verbietet. Eine Ausnahme macht in dieser Beziehung das Leupeptin, dessen orale Gabe möglich und im Tierexperiment bereits erprobt ist.

Da es aufgrund seines extrem niedermolekularen Charakters billig und einfach herzustellen und außerdem wenig toxisch ist, dürfte es, wenn es weiterentwickelt wird, u.U. zu einem der interessantesten Inhibitoren werden. - Die parenterale Applikation der anderen Inhibitoren kann zu unerwünschten Abwehrreaktionen führen, die nur durch genau erprobte Dosierung (wie z.B. beim Trasylol) zu vermeiden sind.

Durch unsere Versuche konnte gezeigt werden, daß Helicin und Trasylol zur Zeit die potentesten Substanzen sind, mit denen man erfolgreich Therapie und Prophylaxe von Schockzuständen betreiben kann; auch die Versuche mit Leupeptin waren sehr ermutigend, da zwischen diesem Inhibitor und dem Trasylol statistisch bezüglich der Überlebensrate keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen waren.

Bezüglich der optimalen Applikationsmenge finden sich in der Literatur keine eindeutigen Angaben. In Übereinstimmung mit uns sind fast alle Autoren jedoch der Meinung, daß es darauf ankommt, Trasylol sehr hoch und über einen Zeitraum von mindestens 3 Tagen zu applizieren (57, 86, 87). Ein wesentliches Ziel ist es hierbei, einen ausreichend hohen Plasmaspiegel des Inhibitors zu erhalten.

Helicin stand uns, wie oben erwähnt, nur begrenzt zur Verfügung. Die unter diesen Umständen günstigste Applikationsmenge ermittelten wir bei 100.000 IE/kg; Erhaltungsdosen zu verabreichen war aus diesem Grunde nicht möglich. Daher verzichteten wir auch beim Trasylol auf diese sonst übliche Therapieform. Das gleiche gilt für Leupeptin; die günstigste Applikationsmenge lag hier zwischen 120 und 160 mg/kg.

Ein zweiter wesentlicher Faktor bei der Behandlung von Schockzuständen ist die Wahl des A p p l i k a t i o n s - z e i t p u n k t e s . Nach unseren Erfahrungen ist zu postulieren, daß er am besten kurz vor Setzen des Traumas liegen sollte. In unseren Voruntersuchungen zeigte sich, daß der optimale Zeitpunkt 5 bis 10 Minuten vor Versuchsbeginn liegt. Injiziert man den Inhibitor kurz nach der Verbrühung, so ist die Mortalität zwar nicht so hoch wie die der Vergleichsgruppe, aber doch erheblich höher als bei Inhibitorgabe vor dem Schock. Es ist anzunehmen, daß die Resorption im bereits geschädigten Organismus stark herabgesetzt ist und daß die durch die verminderte Resorptionsgeschwindigkeit zu kleine Inhibitorkonzentration nur eine abgeschwächte Hemmwirkung ausüben kann.

An dieser Stelle soll noch einmal darauf hingewiesen werden, daß diese Erfahrungen im Tierexperiment gesammelt wurden. Es ist jedoch eine nicht wegzudiskutierende Tatsache, daß die klinische Anwendung von Trasylol auch n a c h einem Schockgeschehen meist zu einem erheblich günstigeren Krankheitsablauf führt (91, 94, 95).

Besondere Beachtung findet auch die Tatsache, daß die Hauptsterberate in der Zeit vom Versuchsbeginn bis zur 24. Stunde lag. Die Tiere, die bis zu diesem Zeitpunkt überlebt hatten, starben bis auf wenige Ausnahmen danach nicht mehr. Daraus läßt sich folgern, daß die wesentlichsten und turbulentesten pathophysiologischen Mechanismen innerhalb dieses Zeitraumes ablaufen und gerade während dieser Stunden intensiv therapiert werden müssen. Diesbezüglich sagen nahezu alle Veröffentlichungen und Publikationen, die sich mit der Wahl des optimalen Applikationszeitpunktes befaßt haben, dasselbe: Trasylol soll so früh wie möglich, am besten schon bei Verdacht auf eine Enzym-entgleisung, gegeben werden (19, 85, 98). So früh wie möglich heißt, daß es am wirkungsvollsten ist, den Inhibitor schon v o r dem Schockgeschehen zu verabreichen.

Das ist natürlich bei Unglücksfällen o.ä. nicht möglich, wohl aber bei großen, vorhersehbaren Operationen und langen Klinikaufenthalten, die häufig zu Lungenembolien, Wundheilungsstörungen u.a. Komplikationen führen können.

Bezüglich Helicin und Leupeptin sind wir ebenfalls zu dem Ergebnis gekommen, daß es am besten ist, diese Substanzen kurz vor dem Schockgeschehen oder, wenn das nicht möglich ist, unmittelbar danach zu applizieren.

Unsere Forderung in dieser Beziehung lautet: Alle Notärzte sollten darauf hingewiesen werden, daß es unbedingt angezeigt ist, schon am Unfallort eine kausale Schocktherapie (Trasytol) einzuleiten und diesen Schritt nicht der Klinik zu überlassen, da bis zur Einlieferung viele Minuten, manchmal sogar Stunden vergehen, die u.U. lebensentscheidend sein können.

Ein dritter Punkt, der in der Literatur große Beachtung findet, ist die gesteigerte *Überlebensrate* unter der Trasytol-Therapie. Die meisten Autoren und wir haben diesbezüglich beste Erfahrungen gemacht (27, 72, 75, 99, 117); nur sehr wenige widersprechen diesen Auffassungen (93). Die vielen Erfolge, die mit Trasytol in Tierexperimenten bezüglich der gesteigerten Überlebensrate erzielt wurden, sind sehr eindrucksvoll; ganz besonders ist jedoch hervorzuheben, daß mit Trasytol auch bei der klinischen Anwendung außergewöhnlich positive Ergebnisse erzielt wurden und daß bei bestimmten Patientengruppen bedeutende Steigerungen der Überlebensraten zu verzeichnen waren (47, 91, 94, 95).

Mit den beiden neuen Inhibitoren Helicin und Leupeptin, die wir im Tierexperiment getestet haben, wurden bezüglich der Steigerung von Überlebensrate und -zeit ausgezeichnete Ergebnisse erzielt. Helicin übertraf sogar das Trasytol im Versuch.

Da die histologischen Veränderungen nach Applikation beider Inhibitoren kaum unterschiedlich waren, nehmen wir an, daß das günstigere Ergebnis des Helicin durch die wesentlich kürzere Bindungszeit dieses Inhibitors in der Niere bedingt ist.

In diesem Zusammenhang soll auf die Arbeit von SPELSBERG (123) hingewiesen werden, der mit einem Protein-
aseninhibitor aus Seeanemonen am gleichen Schockmodell zu ähnlich guten Resultaten kam.

Da alle drei neuen Inhibitoren aus Organismen isoliert wurden, die phylogenetisch erheblich älter sind als der Säugetierorganismus (Trasyolol wird aus Rinderorganen isoliert) und da die physiologische Proteinasehemmung ein ubiquitäres Prinzip der Natur zu sein scheint, ist anzunehmen, daß die neuen Inhibitoren aus diesem Grunde ein undifferenzierteres und breiteres Hemmspektrum besitzen. Wenn es eines Tages gelingen sollte, die neuen Substanzen auch klinisch erfolgreich zu erproben (was bestimmt noch Jahre dauern wird und vielen Arbeitsgruppen als lohnenswerte Aufgabe gelten dürfte), könnte dadurch möglicherweise die Therapie und Prophylaxe von Schockzuständen umfassender und wirkungsvoller betrieben werden als bisher.

17.

Zusammenfassung

Zwei neue Proteinaseinhibitoren - Helicin (aus Weinbergschneckenextrakten) und Leupeptin (aus Streptokokken-Kulturfiltraten) - wurden im Verbrühungsschock an Ratten therapeutisch erprobt. Als Parameter der Wirksamkeit dienten Überlebenszeit, Überlebensrate und Histologie einiger Organe (Leber, Niere, Lunge) von spontan gestorbenen Tieren. Als Vergleich benutzten wir mit Trasylol behandelte (Trasylolgruppen) und unbehandelte Tiere (Vergleichsgruppe). Im allgemeinen Teil wurden ausführlich die Pathophysiologie des Verbrennungsschocks und die Rolle, die das Kallikrein-Kinin-System und die entsprechenden Proteinaseinhibitoren in diesem Zusammenhang spielen, beschrieben.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- 1.) Mit beiden neuen Inhibitoren wurden signifikante Verlängerungen der Überlebenszeit gegenüber der Vergleichsgruppe erreicht; ebenso mit Trasylol.
- 2.) Das beste Ergebnis wurde in zwei Versuchen mit Helicin erzielt: Die mit diesem Inhibitor behandelten Ratten zeigten sogar gegenüber Trasylol und Leupeptin eine signifikante Steigerung der Überlebensrate.
- 3.) Als optimaler Applikationszeitpunkt wurde die Gabe der Inhibitoren kurz vor Schocksetzung ermittelt; ist das nicht durchführbar, so sollte der Inhibitor so bald als irgend möglich verabreicht werden.
- 4.) Als wirkungsvolle Applikationsmenge an Ratten ermittelten wir für Helicin 100.000 IE/kg und für Leupeptin 120 bis 160 mg/kg; Trasylol wurde aus Vergleichsgründen ebenfalls mit 100.000 KIE/kg verabreicht.
- 5.) Die Kombinationsgabe von Trasylol/Leupeptin brachte bezüglich Überlebensrate und -zeit keine Steigerung im Vergleich zu den reinen Trasylolgruppen, wohl aber gegenüber der Vergleichsgruppe.
- 6.) Die patho-histologischen Veränderungen waren nach Trasylol und Helicin gegenüber der Vergleichs- und Kontrollgruppe (Definition S. 88) erheblich geringer. Trasylol und Helicin erwiesen sich in den meisten der histologischen Parameter als gleichwertig.

18.

Literaturverzeichnis

1. ANDERER, F.A.:
Strukturuntersuchungen am Kallikrein-Inaktivator aus
Rinderlunge (Bestimmung der Aminosäuresequenz).
Z.Naturforschung 20:462 (1965).
2. AOYAGI, T., UMEZAWA, H.:
Biological activities of Leupeptins.
J.Antibiotics 24:402 (1971).
3. ARTURSSON, G.:
Pathophysiological Aspects of the Burn Syndrom with
Special Reference to Liver Injury and Alteration of
Capillary Permeability.
Acta Chir.Scandinav.Supp. 274:1 (1961).
4. ARTURSSON, G.:
The Functional Ultrastructure of the Blood-Lymph
Barrier.
Acta Chir.Scandinav.Supp. 374:1 (1972).
5. AUHAGEN, J.:
Dissertation, Med.Akademie, Düsseldorf (1964).
6. BACK, N.:
Proteases and Protease Inhibitors in Exp.Shockstates.
Ann.N.Y.of Sci. 146:491 (1968).
7. BARADUC, H.A.P.:
Des causes de la mort à la suite des brulures super-
ficielles, des moyens de L'éviter.
Paris (1862).
8. BEGEMANN, H.:
Klin.Hämatologie.
Thieme-Verlag, Stuttgart (1974).
9. BELLER, F.K., EPSTEIN, M.D., KALLER, H.:
Distribution, Half Life Time and Placental Transfer
of Trasylol.
Thromb.Diath.Haemorrhag. 16:302 (1966).
10. BERKENHEIER, A.:
Dissertation, Med.Fakultät, München (1973).
11. BERTELLI, A.:
Enzymes and Antienzymes in Inflammatory Reactions.
J.of Dental Research 51:2 (1972).

12. BHARGAVA, N., PABST, W.:
Über die Ausscheidung von Kallikrein-Inaktivator und
sein Verhalten gegenüber Tumorzellen in vivo.
Nutrit.et Dieta (Basel) 5:87 (1963).
13. BLÜMEL, G.:
Experimentelle und klinische Untersuchungen post-
traumatischer Zustände.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
14. BRAASCH, D.:
Erythrocytenflexibilität und Capillarkreislauf.
Pflügers Arch.ges.Physiol. 278:130 (1963).
15. BRECHT, K.:
Über die Wirkung von Trasylol und von anderen vaso-
aktiven Substanzen auf isolierte Arterien und Venen.
Ärztl.Forschung 3:86 (1970).
16. BREDDIN, K.:
Beitrag beim int.Symposium in Vietri sul Mare vom
31. Mai bis 2. Juni 1969.
17. BROERSMA, R.J., BULLEMER, G.D., MAMMEN, E.F.:
Acidosis Induced Disseminated Intravascular Micro-
thrombosis and Streptokinase.
Thromb.Diath.Haemorrhag. 24:55 (1970).
18. BROOKS, J.W., EVANS, E.J., HARM, W.T., REID, J.P.:
The Influence of External Body Radiation on Mortality
from Thermal Burns.
Am.Surg. 136:535 (1952).
19. BÜTZOW, G.H., LINDNER, J., ZAKI, I.:
Der experimentelle Schock und seine Therapie mit
Trasylol.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
20. CASTENHOLZ, A., ROHEN, J.W.:
Morpholog.Grundlagen der Zirkulation und Permeabilität
im Bereich der Endstrombahn.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 3,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1969).
21. CHAMBERS, R., ZWEIFACH, B.W., LOWENSTEIN, B.F.:
Circulation in Tourniquet Shock.
Ann.Surg. 120:791 (1944).

22. CHAUVET, J., ACHER, R.:
The Reactive Site of the Basic Trypsin Inhibitor of
Pankreas.
J.biol.Chemistry 242:4274 (1967).
23. COPE, O., MOORE, F.D.:
Capillary Permeability in Burns.
J.of Clin.Invest. 23:24 (1944).
24. CRUNKHORN, P., WILLIS, A.L.:
Cutaneous Reactions to Intradermal Prostaglandins.
Brit.J.of Pharm. 41:49 (1971).
25. DAVIS, J.H., ABBOTT, W.E.:
The Pathology of Thermal Burns - Changing Concepts.
Surgery 40:788 (1956).
26. DUESBERG, R.:
Hefte Unfallheilkunde 47:27 (1954).
27. EIGLER, F.W.:
Behandlung des Tourniquet-Syndroms mit Trasylol.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 3,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1969).
28. EISEN, V.:
Hypotensive Peptides.
Springer-Verlag, Berlin - New York (1966).
29. ERB, I.H., MORGAN, E.M., FARMER, A.W.:
Pathologie of Burn.
Ibid. 117:234 (1943).
30. ERDÖS, E.G., SLOANE, E.M.:
Inactivation of Bradykinin in Blood.
Biochem.Pharmacol. 11:585 (1962).
31. ERDÖS, E.G.:
Hypotensive Peptides: Bradykinin, Kallidin and
Eledoisin.
Advanc.Pharma. 4:1 (1966).
32. FARRINGTON, G.H., SARAVIS, C.A., COSETTE, G.R.,
CLOWES, C.H.A.jr.:
Bloodborne Factors in Experimental Peritonitis.
Surgery 68:136 (1970).
33. FORELL, M.M.:
Zum Problem der Pankreatitis und der Pankreatitis-
therapie.
Med.Klin. 57:864 (1962).

34. FREY, E.K.:
Zusammenhänge zwischen Herzarbeit und Nierentätigkeit.
Arch.Klin.Chir. 142:663 (1926).
35. FRITZ, H., OPPITZ, K.H., MECKL, D., KLEMKES, B.,
HAENDLE, H., SCHULT, H., WERLE, E.:
Verteilung und Ausscheidung von Proteinaseinhibitoren
nach i.v.-Injektion.
Z.Physiol.Chem. 350:1541 (1969).
36. FRITZ, H., GEBHARD, M., MEISTER, R., ILLCHMANN, K.,
HOCHSTRASSER, K.:
Zur Isolierung von Proteinaseinhibitoren mit wasser-
unlöslichen Trypsin-Celluloseharzen.
Z.Physiol.Chem. 351:571 (1971).
37. FRITZ, H., TSCHESCHE, H.:
Proc.Int.Res.Conf.on Proteinase Inhibitors 271-280,
De Gruyter-Verlag, Berlin - New York (1971).
38. FRITZ, H., HUTZEL, M., WERLE, E.:
Über Proteinaseinhibitoren.
Z.Physiol.Chem. 348:950 (1967).
39. FRITZ, H., FÖRG-BREY, B., UMEZAWA, H.:
Leupeptin and Antipain.
Z.Physiol.Chem. 354:1304 (1973).
40. FRITZ, H.:
Bisher unveröffentlicht.
41. GAZZANIGA, A.B., CONNOR, N.E.:
Effects of Intravenous Infusion of Autologous Kidney
Lysosomal Enzymes in the Dog.
Ann.Surg. 172:804 (1970).
42. GREENWALD, H.M., ELIASBERG, H.:
The Pathogenesis of Death from Burns.
Am.J.of med.Sci. 171:682 (1926).
43. GREUER, W.:
Zur Pathophysiologie und Therapie der Verbrennungs-
krankheit.
Bruns Beitr.Klin.Chir. 198:257 (1959).
44. GREUER, W.:
Die proteolytischen Enzyme im Krankheitsgeschehen.
Editio Contor (1962).
45. GRISOLA, A., FORREST, W.F., PELTIER, L.F.:
The Treatment of Fractures Complicated by Burns on
Experimental Study. 3:259 (1963).

46. GRÖZINGER, K.H., BLÜMEL, G.:
Experimentelle Untersuchungen bei der durch Fett-
emulsionen ausgelösten Pankreatitis der Katze.
Wiener klin.Wschr. 48:847 (1966).
47. GRÖZINGER, K.H.:
Die Inhibitorentherapie der akuten Pankreatitis.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 2,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1968).
48. HABERLAND, G.L.:
Eine kurze Betrachtung zum Konzept der Enzyminhibition.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 6,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1973).
49. HABERMANN, E.:
Arch.Exper.Path.and Pharmacol. 236:492 (1959).
50. HABERMANN, E., KLETT, W.:
Reinigung und einige Eigenschaften eines Kallikreins
aus Schweineserum.
Biochem.Z. 346:133 (1966).
51. HAMBERG, U.:
Plasma Protease and Kinin Release with Special
Reference to Plasmin.
Ann.N.Y.of Sci. 146:517 (1968).
52. HARDAWAY, R.M., JAMES, P.M., ANDERSON, R.W.,
BREDENBERG, C.E., WEST, R.L.:
Man.J.Amer.med.Ass. 199:779 (1967).
53. HARDAWAY, R.M.:
Microcirculation, Hemostasis, and Shock.
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1970).
54. HELLER, W.:
Über die Fettembolie.
Med.Welt 22:1282 (1969).
55. HENNIG, K.:
Dissertation, Med.Fakultät, München (1962).
56. HERSCHLEIN, H.J., STEICHELE, D.F.:
Unterschiedliche Formen der Verbrauchskoagulabilität
und ihre Behandlung.
Med.Welt 44:2389 (1969).

57. HEY, D., LANGER, P.:
Wirkungen und Nebenwirkungen beim Einsatz von Heparin,
Plasmin, Epsilon-Aminocapronsäure und Trasylol im
Verbrühungsschock.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
58. HOLLMANN, W., LIESEN, H.:
Arbeitsuntersuchungen über Wirkungen des Trasylol
auf kardiopulmonale und Stoffwechselfparameter.
Med.Welt 22:36 (1971).
59. HORN, L.:
Reconstructive Plastic Surgery.
Philadelphia 2197 (1964).
60. HORTON, E.W.:
Human Urinary Kinin Excretion.
Brit.J.of Pharm. 14:125 (1959).
61. HURLEY, J., HAM, K.:
Vascular Response to Mild Thermal Injury in the Rat.
J.of Path.and Bact. 95:175 (1968).
62. IDEM, R.:
Renal Function after Burning.
Ibid. 18:572 (1965).
63. ILLIG, L.:
Die terminale Strombahn.
Springer-Verlag, Berlin - New York (1961).
64. JANOFF, A., WEISSMANN, G., ZWEIFACH, B.W., THOMAS, L.:
Pathogenesis of Experimental Shock.
J.of exp.Med. 116:451 (1962).
65. JAWORSKA, M., HANC, I.:
Acta Chir.Plas. (Praha) 7:52 (1965).
66. KALEY, G., WEINER, R.:
Prostaglandin E: A Potential Mediator of the
Inflammatory Response.
Ann.N.Y.of Sci. 180:338 (1971).
67. KALLER, H.:
Tierexperimentelle Untersuchungen über Wirkungsdauer
und Elimination von Trasylol.
Arch.Exp.Pathol.and Pharmakol. 246:92 (1963).

68. KALLER, H.:
Die Beeinflussung experimentell erzeugter Ödeme
durch Trasylol.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 1,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1965).
69. KALLER, H.:
Pharmakologie des Trasylol.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 2,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1968).
70. KASSEL, B., LASKOWSKI, M.:
The Basic Trypsin Inhibitor of Bovine Pankreas.
Biochem.biophys.Res.Comm. 20:463 (1965).
71. KELLER, R., TIMME, W., DISSMANN, W., BUSCHMANN, H.-J.,
DROSS, K., DANGS, J.:
Thalliumvergiftung mit Verbrauchskoagulabilität.
Schweiz.med.Wschr. 101:511 (1971).
72. KILIAN, J., DÖLP, R., REINEKE, H., AHNEFELD, F.W.:
Der Einfluß von Trasylol im exp.hämorrhagischen
Schock auf Kreislaufkriterien und metabolische Größen.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
73. KING, T.C., REYNOLDS, I.E., PRICE, P.B.:
Local Edema and Capillary Permeability Associated
with Burn Wounds.
Forum 6:80 (1955).
74. KOSLOWSKI, L., WASCHKEIT, G.:
Behandlung von Verbrennungen mit einem Ferment-
Inaktivator.
Klin.Wschr. 38:1219 (1960).
75. KOSLOWSKI, L.:
Anwendung von Trasylol bei Verbrennungen.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 3,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1969).
76. KOSLOWSKI, L.:
Verbrennungen und ihre Behandlung.
Med.Welt 20:1263 (1969).
77. KUNITZ, M.:
J.gen.Physiol. 30:311 (1947).
78. LASCH, H.G., KRECKE, H.J., RODRIGUEZ-ERDMANN, F.,
SESSNER, H.H., SCHÜTTERLE, G.:
Verbrauchskoagulopathien.
Folia haemat. 6:1 (1961).

79. LASCH, H.G.:
Schock, Hämostase und Mikrozirkulation.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 3,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1969).
80. LASCH, H.G., HUTH, K., HEENE, L.L., MÜLLER-BERGHAUS, G.,
HÖRDER, M.H., JANZARIK, H., MITTERMAYER, C.,
SANDRITTER, W.:
Deutsche med.Wschr. 17:715 (1971).
81. LEFER, A.M., GLENN, T.M.:
Effect oft Trasylol on the Production of a Myocardial
Depressant Factor in Circulatory Shock.
New Aspects of Trasylol Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
82. LEVENSON, S.M., LUND, C.C.:
Thermal Burns.
DM Oct. (1957).
83. LEWANDOWSKI, Z.:
Dissertation, Med.Fakultät, München.
In Vorbereitung (1974).
84. LEWIS, G.P.:
Handbook of Exp.Pharm. 25:516.
Springer-Verlag, Berlin - New York (1970).
85. LEWIS, D.H., NOLTE, J., SANDEGARD, J., FONDBERG, L.,
SEEMANN, T.:
Local Regulatory Factors and Skeletal Muscle Blood
Flow immediately after Trauma.
New Aspects of Trasylol Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
86. LORTHIOIR, J., LEY, R., SCHNELLS, G.:
Vorläufiger Untersuchungen über die Wirkungen von
Trasylol und Organschäden beim Verbrennungsschock
der Ratte.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
87. LORTHIOIR, J., LEY, R., SCHNELLS, G.:
Trasylol nach Verbrennungen: Organläsionen und
Überlebensraten.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 6,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1973).
88. LUDWIG, H.:
Verbrauchskoagulopathie in der Geburtshilfe.
Med.Klin. 65:2005 (1970).

89. MARDER, V.J.:
Pathologie und Therapie der DIC.
Internist 14:536 (1973).
90. MARX, R., CLEMENTE, P., WERLE, E., APPEL, W.:
Zum Problem eines Antidotes in der internen Thrombo-
therapie mit Fibrinolytika.
Blut 5:367 (1959).
91. MATIS, P.:
Wirkungen von Trasylol auf Blutgerinnung und
Wundheilung.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 2,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1968).
92. MAURER, P., SCHERER, H., MACK, D.:
Verminderung des postischämischen Extremitätenödems
nach wiederherstellenden Arterienoperationen durch
den Proteinaseinhibitor Trasylol.
Med.Welt 2:85 (1971).
93. MESSMER, K., KLÖVEKORN, W.P., SUNDER-PLASSMANN, L.,
BRENDDEL, W.:
Wirksamkeit von Trasylol beim hämorrhagischen Schock
des Hundes.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
94. MÖRL, F.K.:
Die Fettembolie.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 2,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1968).
95. MÖRL, F.K.:
Die Peritonitis.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 2,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1968).
96. MORIWAKI, C., SCHACHTER, M.:
Kininogenase of the Guinea-Pig's Coagulating Gland
and the Release of Bradykinin.
J.Phys. 219:341 (1971).
97. MOYER, C.A.:
The Sociologic Aspects of Trauma with Particular
Reference to Thermal Injury.
Am.J.Surg. 87:421 (1954).

98. MÜLLER-BERGHHAUS, G., HUTH, K., LASCH, H.G.:
Wirkung des Proteinaseinhibitors Trasylol bei der
durch Liquoid-induzierten disseminierten intravasalen
Koagulation.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
99. NAGEL, M., SCHUCH, W.K., RAHMANZADEH, R.:
Untersuchungen zur zusätzlichen Proteinaseinhibitor-
therapie bei der septischen Peritonitis.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 2,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1968).
100. NAKANO, I., KUSAKARI, T.:
Effect of Bradykinin and Eledoisin on the Regional
Circulation.
Angiologie 17:333 (1965).
101. NEMIR, M.D.:
Studies on the Humeral Factor in Pulmonary Embolism.
Springer-Verlag, Berlin - New York (1967).
102. NEUHOF, H., LASCH, H.G.:
Schock, Mikrozyrkulation und Hämostase.
Deutsche med. Wschr. 38:1937 (1970).
103. NICOLAIDES, E.D., DE WALD, H.A., SHORBY, P.G.,
COLLIN, H.O.J.:
Synthesis and Biological Properties of a Special
Octapeptid Related to Bradykinin.
Nature 187:773 (1960).
104. PAAR, D., KÖNIG, E., FONK, J.:
Verbrauchskoagulopathie als Ursache hämorrhagischer
Diathese.
Med.Welt 22:203 (1971).
105. PACK, G.T.:
The Pathology of Burns.
Arch.of Path.and Lab.Med. 1:767 (1926).
106. PALMER, A.A.:
Bibl.anat. (Basel) 9:300 (1967).
107. PAUSCHINGER, P., MATIS, P.:
Das Herzzeitvolumen bei Einhaltung absoluter Ruhe
und seine Beeinflussung durch Trasylol.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).

108. PEARs, H.E., KINGSLEY, H.D.:
The Thermal Burns from the Atomic Bomb.
Surg.Gynec.Obstet. 98:385 (1954).
109. PELTIER, L.F.:
Fat Embolism - a Current Concept.
Clin.Orthop.and Related Res. 66:241 (1969).
110. POPOV, S., EGLI, H., DOHMEN, M.:
Therapie und Prophylaxe der DIC.
Med.Welt 45:2458 (1969).
111. POPOV-CENIC, S., EGLI, H.:
Reaktive Fibrinolyse und Proteinaseinhibition.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 5,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1972).
112. POUYANNE, L., HONTON, J.L., CHEVAIS, R., SENEGAS, J.:
Les embolies graisseuses post-traumatiques.
Rev.de Chir.orthop.et réparatr.de l'App.moteur.
Tome 3:56 (1970).
113. RAKHIT, S.:
On the Structure of the Renin Inhibitor from Dog
Kidney.
Can.J.Biochem. 49:1012 (1971).
114. RITTER, R.:
Das hämolytisch-urämische Syndrom.
Med.Welt 52:2790 (1969).
115. ROCHA E SILVA, M.:
Kallikrein and Histamine.
Nature 145:591 (1940).
116. ROCHA E SILVA, M., BERALDO, W.T., ROSENFELD, G.:
Bradykinin.
Am.J.Phys. 156:261 (1949).
117. ROCKENSCHAUB, A.:
Beeinflussung geburtshilflicher Notsituationen
durch Trasylol.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 3,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1969).
118. ROSSITER, R.J.:
Quart.J.Exp.Phys. 32:279 (1944).
119. SANDRITTER, W.:
Pathologische Anatomie des Schocks.
Vortrag auf dem 16. Berliner Fortbildungskongreß (1967).

120. SEKI, T., NAKAJIMA, T., ERDÖS, E.G.:
Colon Kallikrein, its Relation to the Plasma Enzyme.
Biochem.Pharmacol. 21:1227 (1972).
121. SHOEMAKER, W.C.:
Shock - Chemistry, Physiologie, and Therapie.
Springfield (1967).
122. SPECTOR, W.D., WILLOUGHBY, D.A.:
Experimental Suppression of Inflammation.
J.Pathol.Bact. 78:121 (1959).
123. SPELSBERG, D.:
Dissertation, Med.Fakultät, München.
In Vorbereitung (1975).
124. SCHILDT, B., NILSSON, A.:
Standardised Burns in Mice.
Europ.Surg.Res. 2:23 (1970).
125. SCHÖNBORN, W., PRELLWITZ, W., SCHUSTER, H.P., BAUM, P.,
PEOPLAU, W., BRODERSEN, Ch.:
Verbrauchskoagulopathien bei exogenen Vergiftungen.
Deutsche med.Wschr. 49:2478 (1970).
126. SCHORP, G.:
Dissertation, Med.Fakultät, München.
In Vorbereitung (1974).
127. STENBERG, T., HOGEMANN, K.E.:
Experimental and Clinical Investigations on Liver
Function in Burns.
Ibid. 165:108 (1967).
128. STONE, H.H.:
Respiratory Burns.
Ibid. 165:157 (1967).
129. STRICK, G.:
Structure and Function of Biologically Active Peptides:
Bradykinin, Kallidin, and Congeners.
Ann.N.Y.of Sci. 104:52 (1963).
130. STÜRMER, E.:
Synthesis and Biological Activity of Peptides Related
to Bradykinin.
Experimentia 16:326 (1960).
131. STÜTTGEN, G.:
Archiv Free University of Berlin, Department of
Dermatologie (1970).

132. TRAUTSCHOLD, I., WERLE, E.:
Spektrophotometrische Bestimmung des Kallikrein und
seiner Inaktivatoren.
Z.Physiol.Chem. 325:48 (1961).
133. TRAUTSCHOLD, I., WERLE, E., HAENDLE, H., SEBENING, H.,
KALLER, H., HENNING, N., HEINKEL, K., SCHÖN, H.:
Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie der
Erkrankungen des exokrinen Pankreas.
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1964).
134. TRAUTSCHOLD, I., WERLE, E., FRITZ, H., GROSS, R.,
KRONEBERG, G.:
Zur Biochemie des Trasylol.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 1,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1966).
135. TROLL, W., KLASSEN, K.A., JANOFF, A.:
Tumorigenesis in Mouse Skin.
Science 169:1211 (1970).
136. TSCHESCHE, H., DIETL, D.:
Protease Inhibitors from *Helix pomatia*.
Eur.J.Biochem. 30:560 (1972).
137. TSCHESCHE, H., DIETL, T.:
Identifizierung der Proteinaseinhibitoren syntheti-
sierenden Organe der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*).
Z.Physiol.Chem. 353:1189 (1972).
138. UHLENBRUCK, G., SPRINGER, I., ISHIYAMA, J.:
A New Polyvalent Proteinase-Inhibitor Occuring
in the Albumin Gland of *Helix pomatia*.
Z.Klin.Chem., Klin.Biochem. 9:361 (1971).
139. UMEZAWA, H.:
Enzyme Inhibitors of Microbial Origin.
University Park Press. Baltimore-London-Tokyo (1972).
140. UNDERHILL, F.P.:
Arch.intern.Med. 32:31 (1923).
141. UNDERHILL, F.P.:
Changes in Blood Concentration with Special Reference
to the Treatment of Extensive Superficial Burns.
Ann.Surg. 86:840 (1927).
142. VOGEL, R., TRAUTSCHOLD, I., WERLE, E.:
Natürliche Proteinase-Inhibitoren.
Thieme-Verlag, Stuttgart (1966).

143. WERLE, E.:
Über das Vorkommen von Kallikrein in den Speicheldrüsen und im Mundspeichel.
Biochem.Z. 286:213 (1936).
144. WERLE, E.:
Über den Aktivitätszustand des Kallikreins der Bauchspeicheldrüse und ihres äußeren Sekretes beim Hund.
Biochem.Z. 290:129 (1937).
145. WERLE, E., GÖTZE, W., KEPPLER, A.:
Über die Wirkungen des Kallikreins auf den isolierten Darm und über eine neue darmkontrahierende Substanz.
Biochem.Z. 289:217 (1937).
146. WERLE, E., APPEL, W., HAPP, E.:
Hemmkörper für Trypsin und Kallikrein im Blut der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*).
Arch.Exp.Pathol.and Pharmakol. 234:364 (1958).
147. WERLE, E., TRAUTSCHOLD, I.:
Bestimmung von Trasylol in Blut und Organen und seine Verteilung nach Injektionen.
Münch.med.Wschr. 103:773 (1961).
148. WERLE, E., TRAUTSCHOLD, I., LEYSATH, G.:
Isolierung und Struktur des Kallidin.
Z.Physiol.Chem. 326:174 (1961).
149. WERLE, E., MARX, R., TRAUTSCHOLD, I., REICHENBACH-KLINKE, K.E.:
Einfluß der Proteinase-Inhibitoren auf Fibrinolyse und Blutgerinnung.
Blut 14:206 (1967).
150. WERLE, E., TRAUTSCHOLD, I., HAENDLE, H., FRITZ, H.:
Physiologic, Pharmacologic, and Clinical Aspects of Proteinase Inhibitors.
Ann.N.Y.of Sci. 146:464 (1968).
151. WERLE, E.:
Chemie und Pharmakologie der Plasmakinine und ihre physiologische und pathologische Bedeutung.
Med.Welt 2:1 (1970).
152. WERLE, E.:
Trasylol, ein kurzer Überblick über Geschichte, Biochemie und Wirkungen.
Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 5, Schattauer-Verlag, Stuttgart (1971).

153. WOLFF, W.A.:
Liver Damage and Dextrose Tolerance in Severe Burns.
Ann.Surg. 112:158 (1940).
154. WU, F.C., LASKOWSKI, M.:
Trypsin Inhibitor from Bovine Blood.
J.of Biol.Chemistry 235:1680 (1960).
155. ZEITLIN, I.J.:
Advanc.Exp.Med.Biol. 21:289 (1972).
156. ZIMMERMANN, W.E.:
Presses Académiques Européennes 388-412 (1964).
157. ZWEIFACH, B.W.:
Functional Behaviour of the Microcirculation.
Springfield (1961).

L e b e n s l a u f

Am 2. September 1943 wurde ich als Sohn des selbständigen Kaufmanns Herbert Kwiecinski (†1973) und seiner Ehefrau Paula, geb. Nimz, in Haldensleben geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule (1950 - 1956), der Mittelschule (1956 - 1961; Abschluß: Mittlere Reife) und der Höheren Handelsschule (1961 - 1963) in Berlin arbeitete ich im Hinblick auf die beabsichtigte Übernahme des elterlichen Betriebes von April 1963 bis Mai 1964 als kaufmännischer Volontär in der Importfirma Java-Kaffee, Hamburg und anschließend von Juni 1964 bis August 1965 in der Schokoladenfabrik Herbert Kwiecinski, Berlin, als kaufmännischer Angestellter. Zu dieser Zeit faßte ich den Entschluß, das Abitur nachzuholen und anschließend Medizin zu studieren.

Von September 1965 bis Mai 1969 besuchte ich das Berliner Abendgymnasium "Peter-A.-Silbermann-Schule" (2. Bildungsweg), das ich am 12. Mai 1969 mit dem Reifezeugnis verließ.

Im April 1970 begann ich an der Ludwig Maximilians-Universität in München das Studium der Humanmedizin. 1971 legte ich das Vorphysikum, 1973 das Physikum ab. Im Frühjahr 1976 werde ich mich dem Staatsexamen unterziehen.

Seit dem 26. August 1971 bin ich mit der am 6.3.1944 geborenen Chefsekretärin Monika, geb. Vogt, verheiratet.

Herrn Prof. Dr. Dr. E. W e r l e , der kurz vor Abschluß der Dissertation verstarb, danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes; seinem Nachfolger, Herrn Prof. Dr. rer.nat. H. F r i t z , gilt mein herzlichster Dank für sein Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Dr. med. G. E n g l e r danke ich sehr herzlich für die freundliche Unterstützung und die jederzeit bereitwillig gewährten Ratschläge.

Die Untersuchungen wurden durch Mittel der Europäischen Gemeinschaft für Kohle und Stahl (MONTAN-Union) ermöglicht.

